

# Bruk av gjær 2-hybrid teknologi i jakten på nye typer antibiotika

Masteroppgave i farmasi

Henning Bråten



Avdeling for farmasøytisk  
biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-  
naturvitenskapelige  
fakultet

Universitetet i Oslo



Avdeling for cellebiologi

Institutt for kreftforskning

Radiumhospitalet

Rikshospitalet

Oslo Universitetssykehus

Vår 2010

## Forord

Denne oppgaven ble utført på Avdeling for cellebiologi, Institutt for kreftforskning, Det Norske Radiumhospital fra juni 2009 til mai 2010.

Jeg vil takke min veileder, Kirsten Skarstad, for en spennende oppgave og for god oppmuntring underveis.

Takk til alle medlemmer av ”coligruppen” for et interessant innblikk i et spennende forskningsområde.

En stor takk går til Line Johnsen. Hun har stilt materiale og forskningsresultater til rådighet for denne oppgaven og har brukt utrolig mye tid på praktisk og teoretisk opplæring og veiledning.

## Sammendrag

Bakteriestammer som er resistente mot antibakterielle legemidler er et stadig økende klinisk problem. Klinisk bruk av antibakterielle midler selekterer uunngåelig ut bakterier som huser en resistensmekanisme mot vedkommende middel. Når et nytt antibakterielt legemiddel introduseres, er det derfor bare et spørsmål om tid før en resistent bakteriestamme kan isoleres. Multiresistente patogene bakteriestammer oppstår og en effektiv behandling er da avhengig av at det til enhver tid finnes antibakterielle midler som er introdusert så nylig og brukt så lite at disse stammene ennå ikke har utviklet resistens overfor dem. Det er derfor et konstant behov for nye antibakterielle legemidler og hvis introduksjonen av slike skulle stanse, vil det få svært alvorlige kliniske konsekvenser.

De antibakterielle midlene som er blitt tatt i bruk til nå representerer et svært smalt spekter av virkningsmekanismer. Det er derfor ønskelig å utvikle antibakterielle midler med helt nye virkningsmekanismer og på den måten hindre at introduksjonstakten for nye antibakterielle legemidler blir for lav.

Hemming av interaksjonen mellom DnaA-proteiner er en interessant potensiell ny virkningsmekanisme for antibakterielle legemidler. DnaA er et bakteriespesifikt protein og hemming av dets funksjon kan derfor gi den selektive toksisitet som kreves av et antibakterielt middel. Homooligomerisering av DnaA er nødvendig for initiering av DNA-replikasjon. En kjemisk forbindelse som bryter interaksjonen mellom to DnaA-molekyl vil hemme homooligomeriseringen og dermed initieringen av DNA-replikasjonen og en slik forbindelse vil kunne ha et potensial som antibakterielt middel. Det er nødvendig å utvikle en enkel screening-test for å kunne gjennomføre store bibliotek av kjemiske forbindelser på jakt etter forbindelser som hemmer interaksjonen mellom to DnaA-molekyler.

Gjær 2-hybrid systemet gjør det mulig å studere protein-protein interaksjoner. En transkripsjonsfaktor, GAL4, har to funksjonelle domener, ett som bindes spesifikt til DNA (BD) og ett som bindes til RNA-polymerase og aktiverer transkripsjonen (AD).

Disse to domenene ligger i hver ende av proteinet og mellomstykkets funksjon er å sikre fysisk kontakt mellom de to domenene slik at transkripsjonsfaktoren blir funksjonell. I gjær 2-hybrid systemet finnes ikke et fullstendig GAL4-protein. I stedet introduseres det to nye konstrukter, fusjonsproteinene BD-protein X og AD-protein Y. En interaksjon mellom protein X og protein Y vil bringe BD og AD i fysisk kontakt og dermed gjenopprette en funksjonell transkripsjonsfaktor. Denne transkripsjonsfaktoren aktiverer transkripsjonen av spesielle reportergen i et gjær 2-hybrid system, produktet fra et slik gen gir en fenotypisk endring som lett lar seg monitorere. Slike produkter kan være enzymer i biosynteseveien til essensielle næringsstoffer for gjærcella. En interaksjon mellom protein X og protein Y gir da produksjon av enzymet, gjærcellas biosyntesevei blir komplett, og den produserer det essensielle næringsstoffet. Interaksjonen kan vises makroskopisk ved at gjærcellene vokser på et medium som mangler vedkommende næringsstoff.

DnaA(1-86) betegner en modul med DnaAs aminosyresekvens 1-86 fra aminoterminal ende og DnaA(1-373) betegner en modul med DnaAs aminosyresekvens 1-373 fra aminoterminal ende. I denne oppgaven vises det at DnaA(1-373)-DnaA(1-373) interaksjonen, men ikke DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjonen, kan påvises gjennom aktivering av reportergen *his3*. Det vil derfor være naturlig å gå videre med modulen DnaA(1-373) ved utviklingen av en screeningtest for kjemiske forbindelser som bryter interaksjonen mellom to DnaA-molekyler.

## Forkortelser

A: adenin

ADP: adenosindifosfat

ATP: adenosintrifosfat

bp: basepar

C: cytosin

DNA: deoksyribonukleinsyre

dATP: deoksyadenosintrifosfat

dCTP: deoksyctidintrifosfat

dGTP: deoksyguanosintrifosfat

dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP

dTTP: deoksytymidintrifosfat

*E.coli*: *Escherichia coli*

G: guanin

NaCl: natriumklorid

PEG 3350: polyetylenglykol 3350

r.p.m.: omdreining per minutt (“ revolutions per minute”)

SDS: natriumdodekylsulfat

T: tymin

# Innhold

Forord .....	2
Sammendrag .....	3
Forkortelser .....	5
Innhold .....	6
1. Innledning .....	9
1.1 Bakgrunn for oppgaven .....	9
1.2 Bakteriecellers struktur og antibakterielle legemidlers selektive toksisitet .....	12
1.3 DNA replikasjon i <i>Escherichia coli</i> .....	14
1.4 DnaA proteinet .....	18
1.5 Påvisning av protein-protein interaksjon ved hjelp av gjær 2-hybrid teknologi .....	22
1.6 Hensikt med oppgaven .....	28
2. Materiale og metoder .....	29
2.1 Polymerase chain reaction (PCR) .....	29
2.1.1 PCR-protokoll 1 .....	30
2.1.2 PCR-protokoll 2 .....	31
2.1.3 Protokoll for rensing av genomisk DNA fra <i>E. coli</i> .....	31
2.2 Gelelektroforese .....	32
2.2.1 Gelelektroforeseprotokoll .....	33
2.2.2 Protokoll for rensing av DNA-fragmenter fra gel .....	34

2.3 Spesifikk kutting av dobbelttrådet DNA	
med restriksjonsenzymer .....	34
2.3.1 Protokoll 1 for kutting av DNA	
med restriksjonsenzymer .....	35
2.3.2 Protokoll 2 for kutting av DNA	
med restriksjonsenzymer .....	36
2.3.3 Protokoll for ligering av innskudd i plasmid .....	36
2.4 Protokoll for transformering av plasmid til	
XL10-Gold ultrakompetente celler .....	37
2.5 Protokoll 1 for rensing av plasmid .....	37
2.6 Protokoll 2 for rensing av plasmid .....	38
2.7 Plasmider .....	39
2.8 Gjærstamme AH 109 .....	41
2.8.1 Protokoll for transformering av plasmider til	
AH 109 gjærceller .....	41
2.8.2 Protokoll for tillaging av ”one-step buffer” .....	42
2.9 Seleksjonsmedium og seleksjonsagar .....	42
2.9.1 Protokoll for tillagning av seleksjonsmedium 1/	
seleksjonsagar 1 .....	42
2.9.2 Protokoll for tillagning av seleksjonsmedium 2/	
seleksjonsagar 2 .....	43
2.10 Dråpetest for monitorering av protein-protein interaksjon	
i AH 109 gjær 2-hybrid systemet .....	43
2.10.1 Protokoll for dråpetest .....	44
2.11 pGEM-T Easy vektor systemet brukt ved subkloning	
av <i>dnaA</i> (1-373) .....	45
2.12 Sammenligning av DNA-sekvenser .....	46

3. Resultater .....	47
3.1 Konstruksjon av primere for PCR amplifisering av domene I av <i>dnaA</i> genet .....	47
3.2 PCR av domene I av <i>dnaA</i> genet .....	48
3.3 Kloning av <i>dnaA</i> (1-86) inn i vektor pGBKT7 .....	48
3.4 Kloning av <i>dnaA</i> (1-86) inn i vektor pGADT7 .....	50
3.5 Transformering av plasmidene pGBKT7/ <i>dnaA</i> (1-86) og pGADT7/ <i>dna</i> (1-86) inn i gjærstammen AH 109 med undersøkelse av toksisitet og autoaktivering .....	52
3.6 DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjonen kan ikke påvises gjennom aktivering av <i>his3</i> -genet .....	54
3.7 Konstruksjon av primere for PCR amplifisering av domene I-III av <i>dnaA</i> genet.....	56
3.8 PCR av domene I-III av <i>dnaA</i> genet.....	57
3.9 Kloning av <i>dnaA</i> (1-373) inn i vektor pGBKT7 .....	58
3.10 Kloning av <i>dnaA</i> (1-373) inn i vektor pGADT7 .....	62
3.11 DnaA(1-373)-DnaA(1-373) interaksjonen kan påvises gjennom aktivering av <i>his3</i> genet .....	66
4. Diskusjon .....	69
4.1 DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjonen er ikke egnet til bruk i gjær 2-hybrid screening .....	69
4.2 DnaA(1-373)-DnaA(1-373) interaksjonen kan brukes i gjær 2-hybrid screening .....	70
4.3 Utvikling av en positiv screen ved hjelp av <i>ura3</i> reportergen og 5-fluoroorotinsyre .....	71
5. Referanseliste .....	72
6. Appendiks .....	76



# 1. Innledning.

## 1.1 Bakgrunn for oppgaven.

Årene mellom 1940 og 1960 er blitt kalt ”de gylne år” innen antibiotikaoppgivelse. Stadig nye antibiotikagrupper med ulik kjemisk struktur ble oppdaget og bakterieinfeksjoner som tidligere var en viktig dødsårsak ble, i det minste i de såkalte I-landene, redusert til rariteter på dødsstatistikkene. Særlig inntrykk gjorde den effektive bekjempelsen av dødelige bakterieinfeksjoner som rammet barn og unge så som pneumonier og sårinfeksjoner samt det at tuberkuloseepidemien ble brakt under kontroll. Antibiotikarevolusjonen var også en forutsetning for den enorme utviklingen av kirurgisk medisin som fant sted, stadig mer omfattende og imponerende prosedyrer kunne utvikles nå da de postkirurgiske infeksjonene kunne kontrolleres (Salyers og Whitt, 2002). Tidlig i perioden dukket det imidlertid opp et problem; et antibiotikum som tidligere hadde vært effektivt mot en viss bakterie, hadde ikke lenger effekt i alle tilfeller av infeksjoner med denne bakterien. I klinikken ble dette problemet løst ved at man byttet til et annet antibiotikum og da man etter hvert fikk et betydelig spekter å spille på, var konsekvensen for pasienten sjelden verre enn et noe forlenget sykdomsforløp. Antibiotikaresistens var ennå ikke blitt et klinisk problem (Salyers og Whitt, 2002).

Tiden rundt 1960 markerte et klart skille i utviklingen av antibakterielle legemidler. Introduksjonen av stadig nye kjemiske grunnstrukturer med antibakteriell effekt stoppet fullstendig opp. I 1962 kom kinolonene og det skulle gå nesten 40 år før oxazolidinonene med neste nye grunnstruktur kom på banen. (Linezolid ble godkjent for klinisk bruk i USA i 2000) (Walsh, 2003). Nye antibakterielle legemidler ble introdusert i disse årene, men samtlige var utviklet ved å innføre relativt små endringer på allerede kjente grunnstrukturer. Begrepene ”annen- og tredjegenasjons” ble tatt i bruk for nye antibakterielle midler i flere ulike grupper. Utviklingen ga legemidler med bedre farmakokinetiske og farmakodynamiske egenskaper, noe som kunne gi seg utslag i bl.a. utvidet antibakterielt spekter, redusert

toksisitet, færre bivirkninger og et mer hensiktsmessig doseringsregime. De nye legemidlene ga altså utvilsomt betydelige kliniske fordeler (Walsh, 2003). Strategien var imidlertid ikke optimal når det gjaldt utviklingen av resistens, ofte forelå det kryssresistens med tidligere anvendte midler eller det oppsto resistens mot de nye midlene relativt raskt. Legers ukritiske forskrivning av antibiotika ga et overforbruk med en akselererende seleksjon av resistente bakteriestammer. Multiresistente stammer ble et klinisk problem, i første omgang særlig i sykehusmiljø (Salyers og Whitt, 2002). Et annet forhold som fremmet seleksjonen av resistente stammer var pasienters tendens til å kutte ned kuren i dose og/eller varighet p.g.a. kostnad, bivirkninger eller generelle complianceproblem. Særlig utsatt var tuberkulosebehandlingen med kombinasjonen av behov for langvarig regelmessig behandling og ofte svært ressurssvake pasienter, og multiresistente stammer av *Mycobacterium tuberculosis* dukket opp (Salyers og Whitt, 2002). Etter hvert kuttet flere av de store legemiddelselskapene kraftig ned på satsingen på utvikling av nye antibakterielle legemidler og en del trakk seg helt ut (Walsh, 2003). Behandling av akutte bakterielle infeksjoner har helbredelse som mål og behandlingen vil i sin natur være kortvarig. Inntjeningspotensialet er derfor i utgangspunktet lavere enn for legemidler rettet mot forebygging eller lindring av kroniske sykdommer som hjertekarsykdommer, astma og muskel/leddplager hvor behandlingen er langvarig, ofte livslang (Salyers og Whitt, 2002).

To ulike grunnstrategier er benyttet i utviklingen av nye antibakterielle midler. Dels er det søkt etter antibakteriell virkning av biosynteseprodukter fra sopp og bakterier og det er disse forbindelsene som har fått betegnelsen antibiotika. Etter isolering og karakterisering er disse kjemiske forbindelsene dels blitt brukt som antibiotika, dels har de dannet utgangspunkt for kjemiske modifikasjoner som kan føre fram til semisyntetiske antibiotika. Denne strategien var den helt dominerende i ”de gylne år” for antibiotikaopptdagelse (Walsh, 2003). Den andre strategien tar utgangspunkt i forbindelser produsert ved kjemisk syntese. Sulfaforbindelser ble introdusert på 1930-tallet og har vært i kontinuerlig klinisk bruk siden. Etter at biosynteseproduktene dominerte fullstendig har helsyntetiske forbindelser fått en renessanse, f.eks. hører kinoloner og oxazolidinoner til denne gruppen (Walsh, 2003). Bruk av kombinatorisk kjemi (combinatorial chemistry) har gjort det mulig å bygge opp enorme bibliotek av kjemiske forbindelser og utvikling av ”high throughput

screening” teknologi har åpnet for at et svært stort antall forbindelser kan testes for interaksjoner med interessante biologiske målmolekyler med et akseptabelt tidsforbruk (Walsh, 2003). En annen gren av utviklingen er ”rational drug design” hvor bioinformatikk brukes til å konstruere kjemiske forbindelser in silico ved å tilpasse den tredimensjonale strukturen til biologiske målmolekylers tredimensjonale struktur for å øke sannsynligheten for aktive interaksjoner (Salyers og Whitt, 2002). Selv om biosynteseprodukter ser ut til å være trengt noe tilbake fra forskningsfronten er det slett ikke utenkelig at denne strategien kan oppleve en ny vår. Fullstendig kartlegging av genomet til organismer som ikke har latt seg dyrke i laboratorium gir en nærmest uuttømmelig kilde til nye gener som kan klones inn i vektorer og uttrykkes som protein. Helt nye biosynteseveier og dermed biosynteseprodukter kan dermed oppdages (Walsh, 2003). Et viktig argument for arbeidet med å opprettholde mangfoldet av biologiske arter er nettopp at menneskeheten ikke skal bli frarøvet muligheten for framtidlige oppdagelser av viktige legemiddelforbindelser.

De første oppdagelsene av antibakterielle legemidler ble gjort rent empirisk, det ble konstatert en antibakteriell effekt i laboratoriet. Virkningsmekanismen for de ulike antibakterielle midler ble først klarlagt senere og det har vist seg at de antibakterielle midler som er tatt i klinisk bruk inntil i dag representerer et svært snevert spekter av virkningsmekanismer.

Disse virkningsmekanismene er:

- hemming av bakteriell celleveggsyntese
- hemming av bakteriell proteinsyntese
- hemming av bakteriell folatmetabolisme
- hemming av bakteriell DNA-topoisomeraseaktivitet
- hemming av bakteriell RNA-polymeraseaktivitet
- bruddannelse i bakterielt DNA

(Salyers og Whitt, 2002).

Legemiddelprodusentene har vist en konservativ tendens i sine søk etter nye antibakterielle legemidler idet forbindelser som har samme virkningsmekanisme som allerede klinisk anvendte forbindelser er blitt prioritert. Det er blitt antatt at sannsynligheten for å nå en markedsføringstillatelse er større for slike forbindelser enn for forbindelser med en helt ny virkningsmekanisme (Salyers og Whitt, 2002).

Utviklingen av multiresistente bakterier har imidlertid gitt et politisk press for å søke etter antibakterielle legemidler med nye angrepspunkter (Salyers og Whitt, 2002). Et eksempel på en ny mulig virkningsmekanisme er hemming av enzymgruppen sortaser (Maresso og Schneewind, 2008), et annet eksempel er hemming av enzymer i det bakteriespesifikke non-mevalonat biosyntesespolet til isoprenoider (Walsh, 2003) (se 1.2). Det fullstendige genomet til stadig flere bakteriestammer blir kartlagt og dette gjør det mulig å sammenlikne genomet til patogene bakteriestammer med genomet til ikke-patogene slektninger. Slik kan det finnes åpne leserammer som er spesifikke for patogene bakterier. Eventuelle patogenspesifikke protein som oppdages kan utgjøre angrepspunkter for nye antibakterielle midler (Salyers og Whitt, 2002).

Denne oppgaven vil omtale hemming av homooligomeriseringen av det bakterielle proteinet DnaA som en mulig mekanisme for nye antibakterielle midler (se 1.2).

## 1.2 Bakteriecellers struktur og antibakterielle legemidlers selektive toksisitet.

Antibakterielle legemidler må ha en selektiv toksisitet. De skal ha en maksimal toksisitet overfor bakteriene de skal angripe og en minimal toksisitet overfor cellene i organismen som skal behandles for en bakteriesykdom (Salyers og Whitt, 2002).

Et ideelt biologisk mål for slike legemidler vil da være strukturer som finnes i bakterieceller men ikke i f.eks. humane celler. Den bakterielle celleveggen er en slik struktur og flere antibiotikagrupper har hemming av celleveggsyntesen som sin virkningsmekanisme. Dette gjelder  $\beta$ -laktamer med penicilliner, cefalosporiner, karbapenemer og monobaktamer samt glykopeptidene vankomycin og teikoplanin (Salyers og Whitt, 2002; Denyer et al., 2004). Et annet bakteriespesifikt mål er enzymgruppen sortaser som katalyserer bindingen av proteinstrukturer til peptidsidekjeder i peptidoglykan i celleveggen, disse proteinstrukturene eksponeres på bakterieoverflata og utgjør ofte viktige virulensfaktorer for patogene bakteriestammer (Salyers og Whitt, 2002). Sortase katalyserer også polymeriseringen av pilinheter til pilusstrukturer som likeledes virker som virulensfaktorer. Utvikling

av sortasehemmere er ett spor som nå følges i jakten på nye antibakterielle legemidler (Maresso og Schneewind, 2008). Biosynteseporene i bakterier og humane celler kan også være ulike selv om sluttproduktet er det samme. Hemmere av bakteriespesifikke enzymer i slike spor kan ha potensial som antibakterielle legemidler, et eksempel på et bakteriespesifikt biosyntesepor er non-mevalonat sporet for isoprenoider (Rohdich et al., 2001). Hvis denne banen blokkeres vil syntesen av et lipid som fungerer som en transmembrantransporter stanse. Denne transporteren er essensiell for bakterienes celleveggsyntese (Walsh, 2003).

Bakterielle og humane strukturer som har samme funksjon i cella er ofte gitt samme navn, men de kan likevel ha så ulik oppbygging at en kjemisk forbindelse som hemmer vedkommende funksjon i bakterier, ikke har noen innvirkning på funksjonen hos mennesket. Kroneksempelen er ribosomet og flere tradisjonelle antibakterielle midler virker ved å hemme bakteriens proteinsyntese etter interaksjon med bakterieribosom uten at humane ribosom påvirkes. Dette gjelder aminoglykosider, makrolider, kloramfenikol og de relativt nylig introduserte streptograminer (Salysers og Whitt, 2002). Tetracykliner virker også ved å hemme bakteriell proteinsyntese, men her skyldes den selektive toksisiteten at bakterieceller, i motsetning til humane celler, har et transportsystem som sørger for at tetracyklinene kan transporteres over cellemembranen (Denyer et al., 2004). Enzymet dihydrofolatreduktase er nødvendig for biosyntesen av tetrahydrofolat. Denne forbindelsen er en kofaktor ved overføring av en-karbonenheter, noe som er essensielt ved biosyntesen av DNA (Salysers og Whitt, 2002). Strukturen til dette enzymet varierer mellom ulike organismer og selektiv toksisitet for ulike kjemiske forbindelser kan her illustreres med kjente legemidler. Trimetoprim hemmer det bakterielle enzymet og brukes som antibakterielt legemiddel, metotreksat hemmer det humane enzymet og brukes som et cytostatikum, mens sykloguanil hemmer enzymet i plasmodiumprotozoer og brukes som antimalariamiddel (administrert som prodrugen proguanil) (Rang et al., 2003). Funksjonelle type II topoisomeraser er en forutsetning for DNA-replikasjon (se 1.3). Kinoloner hemmer bakteriell topoisomerase II (DNA gyrase) og bakteriell topoisomerase IV (begge type II topoisomeraser), men ikke humane type II topoisomeraser (Salysers og Whitt, 2002). Metronidazol har en helt annen mekanisme for sin selektive toksisitet. Denne forbindelsen må gjennomgå en kjemisk aktivering for å kunne virke ved å lage brudd i DNA-kjeder. Det bakterielle proteinet

flavodoksin er nødvendig for denne aktiveringen og metronidazol kan derfor ikke aktiveres i humane celler (Salyers og Whitt, 2002).

DnaA virker som initiator for DNA-replikasjonen i bakterier (se 1.4). Det er strukturelt svært forskjellig fra det proteinkomplekset som har den samme funksjonen i humane celler (Mott og Berger, 2007). En kjemisk forbindelse som hemmer DnaAs initiatorfunksjon ved å hemme homooligomeriseringen av DnaA (se 1.4) er derfor en kandidat til å vise den nødvendige selektive toksisitet som kreves av et antibakterielt legemiddel (Fossum et al., 2008).

### 1.3 DNA replikasjon i *Escherichia coli*.

DNA replikasjonen i *Escherichia coli* initieres (se fig.1) ved at proteinet DnaA danner en homooligomer på det sirkulære kromosomet på regionen *oriC* (Mott og Berger, 2007). Denne homooligomeriseringen gjør at DNA-dobbeltråden tvinnes opp til enkelttrådet DNA i en spesifikk del av *oriC*, kalt DUE ("DNA-unwinding element") (Mott og Berger, 2007). DnaA interagerer med helikasen DnaB og denne interaksjonen rekrutterer helikasen til eksponert enkelttrådet DNA (Messer, 2002). DnaB er i utgangspunktet holdt i en inaktiv konformasjon av chaperonproteinet DnaC (Baker og Bell, 1998). DnaC spaltes fra DnaB-DnaC komplekset under ATP hydrolyse (Ozaki og Katayama, 2009) og DnaB kan bevege seg langs tråden mens den bryter hydrogenbindingene mellom baseparene i DNA-dobbeltråden slik at nye områder tvinnes opp til enkelttrådet DNA (Baker og Bell, 1998). I sin nye konformasjon kan DnaB binde primasen DnaG og det dannes et kompleks kalt primosom. Primasen bruker enkelttrådet DNA som templat og katalyserer syntesen av en komplementær RNA-sekvens ca.11 nukleotider lang. En "β-sliding clamp" lastes på den nye strukturen slik at den danner en dimer ringform rundt strukturen og subenheter bindes til slik at det dannes en funksjonell DNA-polymerase; DNA pol III holoenzym (se fig.1). Dette enzymet bruker RNA-sekvensen som en primer og katalyserer syntesen av en ny DNA-tråd som en fortsettelse av primeren og ved å bruke den opprinnelige DNA-enkeltråden som templat (Baker og Bell, 1998). DNA-polymeraser krever alltid en primer hvor syntesen kan starte. Syntesen foregår også

alltid bare i en retning, fra 5`-til 3`-ende. Det innkommende nukleotidets  $\alpha$ -fosfat danner altså alltid esterbinding med hydroksylgruppa i 3`-posisjon i deoksyriboseenheten (Baker og Bell, 1998).

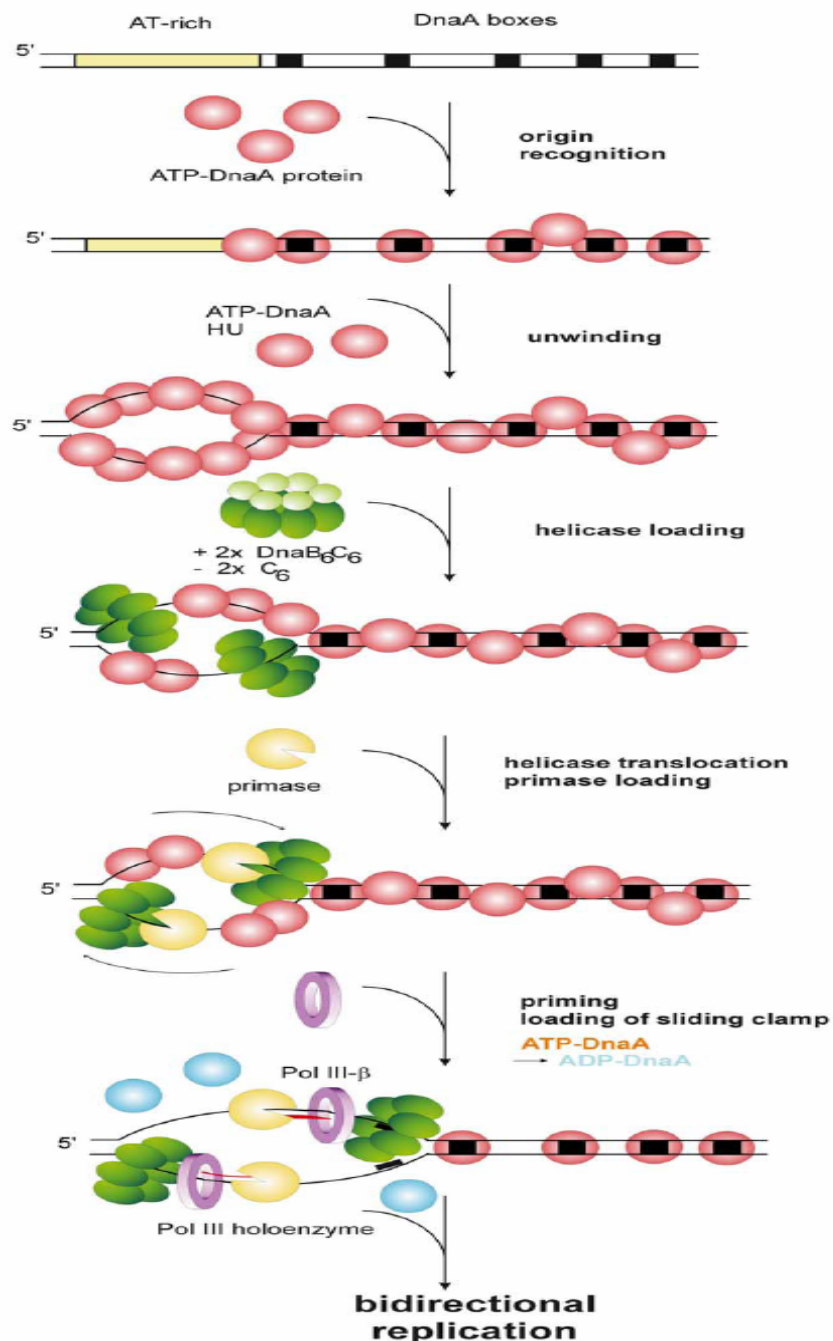


Fig.1

Initieringen av replikasjonen i *Escherichia coli* (Messer,2002).

DNA-replikasjonen i *Escherichia coli* er bidireksjonell. Ut fra initieringspunktet i *oriC* beveger det seg to komplekser, replisomer, en i hver retning langs kromosomet. Hvert replisom består av de proteiner som er nødvendige for replikasjonen og inneholder bl.a. en helikase, en primase og to DNA pol III holoenzym. Der replisomet til enhver tid befinner seg vil det dannes en Y-struktur på kromosomet; en replikasjongsaffel (Baker og Bell, 1998). Andre elementer er også nødvendige for en funksjonell replikasjon. Enkeltrådet-DNA er ustabilt i den forstand at det lett dannes hydrogenbindinger mellom baser i komplementære sekvenser på ulike steder i samme enkelttråd. Slike løkkedannelser vil lage problemer for replikasjonen. SSB, ”singel-strand DNA binding protein”, bindes til enkelttrådet DNA og hindrer at dette problemet oppstår (Alberts et al., 2002). Opptvinningen av DNA-dobbeltråden fører til at det bygger seg opp mekanisk spenning i DNA-dobbeltheliksen foran replikasjongsaffelen og denne spenningen vil etter hvert utgjøre en hindring for videre replikasjon. Det må derfor skje en avspenning og dette sørger DNA-gyrase for. Dette proteinet kutter begge trådene i dobbeltheliksen, trer en annen del av dobbeltheliksen gjennom den nydannede spalten og ligerer deretter begge trådene slik at spalten lukkes. På denne måten introduseres ”negative supercoils” og den mekaniske spenningen reduseres (Alberts et al., 2002). Trådene i DNA-dobbeltheliksen er antiparallelle, det vil si at retningen fra 5'- til 3'-ende løper motsatt vei i de to trådene. Begge trådene replikeres samtidig etter hvert som replikasjongsafflene beveger seg langs kromosomet. Den nydannede tråden vil måtte løpe antiparallelt i forhold til sitt templat. Ett templat vil leses i retning 3'- til 5'-ende når replikasjongsaffelen avanserer og den nye tråden kan syntetiseres kontinuerlig i retning 5'-til 3'-ende i henhold til DNA-polymerasens spesifisitet. Syntesen fra templatet som løper i motsatt retning må imidlertid organiseres annerledes. Denne DNA-tråden slynges opp slik at den får motsatt retning i rommet i forhold til den opprinnelige og kan da fungere som templat for DNA-syntese i retning 5'-til 3'-ende etter at primasen først har lagt ned en primer (se fig.2 ).



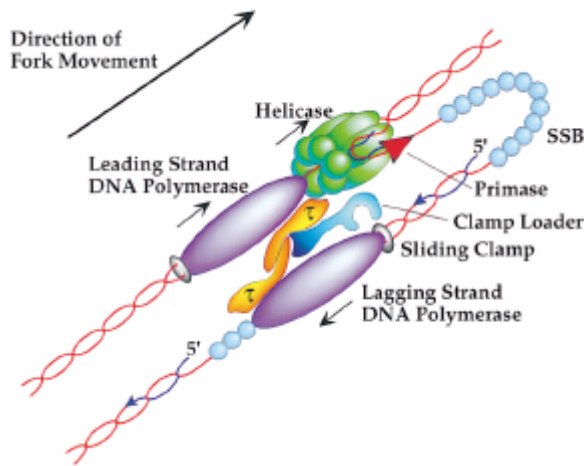


Fig.2

Modell av replisomet (Baker og Bell, 1998)

Den nysyntetiserte DNA-biten er i *Escherichia coli* 1000-2000 nukleotider lang og kalles et Okazaki-fragment (Baker og Bell, 1998). Etter at syntesen av ett slikt fragment er fullført, slynges DNA-tråden som skal tjene som templat på nytt opp og prosessen gjentas. Syntesen av denne DNA-tråden er følgelig diskontinuerlig og syntesen av Okazaki fragmentet termineres når DNA pol III holoenzym møter primeren til forrige Okazaki fragment som er bundet langs templatet (Alberts et al., 2002). En annen DNA-polymerase, DNA pol I, vil fjerne RNA-primeren og syntetisere DNA-tråden i det oppståtte tomrommet på en templatstyrt måte. DNA-ligase fullfører så syntesen i denne regionen ved å katalysere dannelsen av den manglende esterbindinga i DNA-kjeden (Baker og Bell, 1998). De to replikasjonsgaflene løper i hver sin retning rundt kromosomet inntil de møtes, replisomene dissosierer fra DNA-tråden og replikasjonen er fullført (Baker og Bell, 1998).

## 1.4 DnaA proteinet.

DnaA-molekylet kan deles inn i 4 funksjonelle domener (Messer et al., 1999). Disse domenene ble først definert på grunnlag av sekvenshomologi mellom DnaA-molekyler fra ulike bakteriearter og er senere bekreftet og justert etter funksjonelle studier. Den nedenstående oppbyggingen refererer til DnaA fra *Escherichia coli* (Messer et al., 1999). Det aminoterminal domenet I består av aminosyre 1-86 og inneholder motiver som medierer binding til henholdsvis DnaB (Messer et al., 1999) og proteinet DiaA (Ishida et al., 2004), samt et motiv som medierer homooligomerisering av DnaA (Messer et al., 1999). Domene II består av aminosyre 87-134. Dette domenet viser liten homologi i sekvens og lengde mellom ulike bakteriearter. Det er antatt at den fungerer som et fleksibelt mellomstykke (Mott og Berger, 2007). Domene III består av aminosyrene 135-373 og inneholder motiver som medierer henholdsvis binding av ATP/ADP og ATPase-aktivitet (Messer et al., 1999), samt et motiv som medierer homooligomerisering av DnaA (Mott og Berger, 2007; Messer et al., 2001). Det karboksyterminale domenet IV består av aminosyrene 374-467 og inneholder motiver som medierer binding til de spesifikke bindingssetene på DNA (Messer et al., 1999).

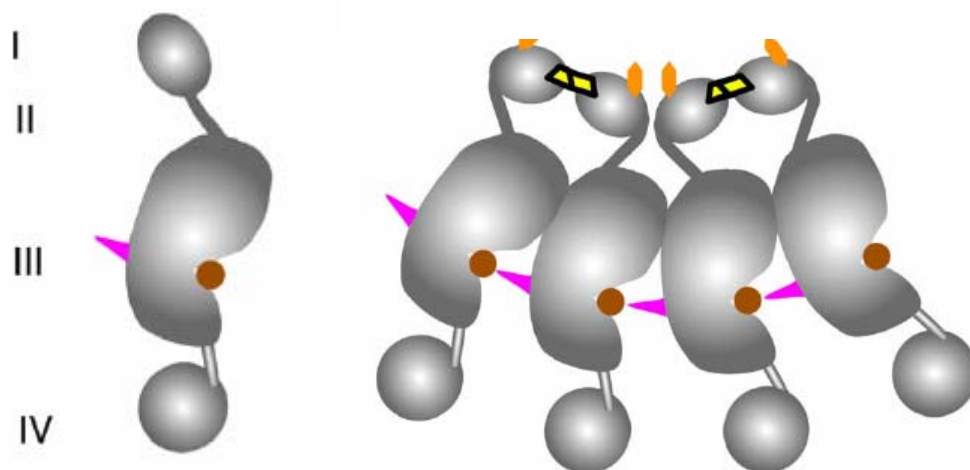


Fig.3

Skjematisk framstilling av DnaA homooligomeriseringen (Ozaki og Katayama, 2009).

Fig.3 viser at både domene I –domene I interaksjoner og domene III-domene III interaksjoner deltar ved homooligomeriseringen av DnaA.

DnaA fungerer som initiator for DNA replikasjonen (Mott og Berger, 2007). Dannelse av en DnaA homooligomer på kromosomets *oriC*-region er den begivenhet som starter hele replikasjonsprosessen (Bramhill og Kornberg, 1988). *OriC* inneholder ulike basesekvenser som binder DnaA spesifikt. Disse bindingssetene kan deles inn i to hovedgrupper ( Ozaki og Katayama, 2009). Den første gruppen er DnaA-bokser som binder DnaA gjennom hele cellesyklus og dermed lokaliserer DnaA til *oriC* . DnaA bindes til disse bindingssetene uavhengig av om proteinet har bundet ADP eller ATP (Mott og Berger, 2007). Den andre gruppen av bindingsseter har lavere affinitet for DnaA og binding krever at proteinet har bundet ATP (Mott og Berger, 2007). Initiering av replikasjonen er avhengig av at DnaA bindes til sine lavaffinitetsseter (Katayama, 2008). Bindingen av DnaA til et slik lavaffinitetssete fremmes og stabiliseres ved at både vedkommende DnaA-molekyl og et DnaA-molekyl på en nærliggende DnaA-boks er bundet til en tetramer av proteinet DiaA. DnaA bundet til DnaA-boksen gir riktig lokalisering og DiaA-tetrameren gjør at det andre DnaA-molekylet holdes fast i riktig område og dermed øker sannsynligheten for binding til lavaffinitetssetet (Katayama, 2008). Interaksjon mellom  $\gamma$ -fosfatgruppen til ATP og en spesifikk argininmodul i DnaA gir en konformasjonsendring slik at et aktivt sete for interaksjon med et annet DnaA-molekyl avdekkes på overflaten (Mott og Berger, 2007). Denne interaksjonen illustreres på fig.3 hvor ATP er markert med brunt og argininmodulen er markert med magenta. Homooligomeriseringen av DnaA resulterer i en åpen høyredreide heliksstruktur ved at en kile på overflata fysisk leder retningen av oligomeriseringsprosessen (Mott og Berger, 2007). Dobbeltrådet DNA ligger snodd på yttersiden av denne heliksstrukturen og dette introduserer positive "supercoiler". I det lukkede systemet som et sirkulært kromosom utgjør, vil det induseres kompensatoriske negative "supercoiler" (Mott og Berger, 2007) (se fig.4). *OriC* inneholder en region som er særlig rik på A-T basepar. Det er lettere å bryte bindinga mellom et A-T basepar som holdes sammen av 2 hydrogenbindinger enn mellom et C-G basepar som holdes sammen av 3 hydrogenbindinger. Regionen rik på A-T basepar kalles DUE ("DNA-unwinding element") og DNA trådene vil lettest kunne skilles her. Det kan tenkes at stresset fra de kompensatoriske negative "supercoilene" konsentreres i DUE og at det er dette som er årsaken til at dobbeltrådet DNA skilles til enkelttråder i denne regionen (Mott og Berger, 2007)

(se fig.4 ). De nydannede DNA-enkelttrådene stabiliseres så ved interaksjoner med den indre overflata av DnaA-homooligomerheliksen (Ozaki og Katayama, 2009) (se fig.4 ).

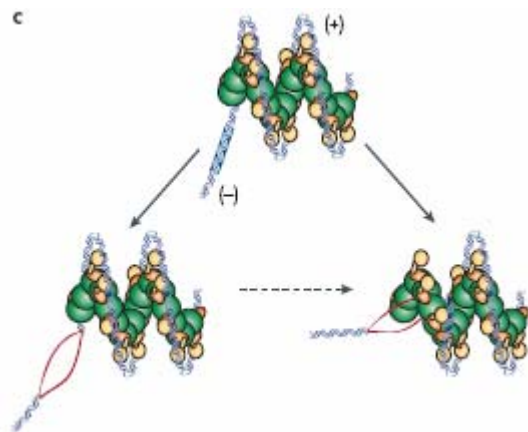


Fig.4

Oppkveiling av DNA på DnaA-homooligomeren  
gir separasjon til enkelttråder (Mott og Berger,2007).

Fig.4 gjengir en modell som bygger på krystallstrukturen for DnaA domene III-IV (Mott og Berger, 2007). Domene I-domene I interaksjon inngår derfor ikke i denne modellen.

Det neste trinnet i DNA replikasjonen er binding av helikasen DnaB til DNA-enkelttråden. DnaB er i utgangspunktet bundet til chaperonproteinet DnaC som holder det i en inaktiv konformasjon. DnaA interagerer så med DnaB som lokaliseres til eksponert enkelttrådet DNA, DnaC spaltes av og DnaB inntar en aktiv konformasjon (Baker og Bell, 1998).

Med dette er DnaAs funksjon i initieringen av DNA replikasjonen avsluttet. Det skjer nå en inaktivering av DnaA-homooligomeren kalt RIDA ("regulatory inactivation of DnaA") (Nishida et al., 2002). Proteinet Hda ("homologous to DnaA") er sentral i denne prosessen (Kato og Katayama, 2001). Deaktiveringen er knyttet til igangsatt replikasjon ved at Hda for å utøve sin funksjon må være bundet til "β-sliding clamp" som omslutter DNA tråden ved replikasjonen. Hda bindes så til DnaA og induserer en konformasjonsendring som gjør at DnaAs ATPaseaktivitet stimuleres slik at den når

et funksjonelt nivå og bundet ATP hydrolyseres til ADP. DnaA som nå har bundet nydannet ADP, kan ikke lenger opprettholde sin homooligomerstruktur og denne disintegrerer (Suetsugu et al., 2005). Bindingen mellom DnaA og ADP må brytes for at DnaA-molekylet på ny kan "lades" med ATP og bli aktivt. Brytningen av bindingen mellom DnaA og ADP fremmes av interaksjon mellom anioniske fosfolipider og en region av DnaA ( den karboksyterminale ende av domene III sammen med den aminoternale ende av domene IV) (Makise et al., 2001).

Flere mekanismer som hindrer DnaA overaktivitet og dermed overinitiering av replikasjon, er virksomme (Boye et al., 2000). GATC-sekvenser i DNA adeninmetyleres av Dam metyltransferase. Etter syntesen av den nye DNA-tråden er det et tidsvindu hvor denne metyleringen ennå ikke har skjedd og DNA-dobbeltråden er følgelig hemimetylert. Et protein, SeqA, bindes med høy affinitet til slike hemimetylerte områder (Brendler et al., 1995). Da *oriC* er rik på GATC-sekvenser vil SeqA være bundet her lenger enn til andre områder, opptil 1/3 av cellesyklus (Campbell og Kleckner, 1990). Flere DnaA-bindingssteder overlapper med GATC-sekvenser og SeqA binding kan dermed direkte blokkere DnaA-binding og replikasjonsinitiering ( Mott og Berger, 2007). Nylig replikerte *oriC* sekvestreres og er ikke tilgjengelig for replikasjonsinitiering. Sekvestrering kan regnes som et førstelinjeforsvar mot overinitiering og andre mekanismer tar over når SeqA ikke lenger er bundet til *oriC* (Boye et al., 2000). Deaktivering av DnaA ved aktivert ATPasefunksjon som beskrevet over er en slik mekanisme (Boye et al., 2000). Konsentrasjonen av fritt DnaA bringes også ned på et nivå som er under terskelverdien for initiering av replikasjonen. DnaA-bindingssteder på andre deler av kromosomet fungerer i denne sammenheng som et "avløp" for overtallige DnaA-molekyler. Et område med særlig høy DnaA-bindingskapasitet er *datA*-lokus (Kitagawa et al., 1998), det ligger nær *oriC* og dupliseres følgelig kort tid etter replikasjonsinitieringen og har altså meget høy DnaA-bindingskapasitet før sekvestreringen opphører (Boye et al., 2000). DnaA fungerer også som en regulator for transkripsjon, bl.a. hemmer det transkripsjonen av *dnaA*-genet (Messer og Weigel, 1997). Dette er en mulig reguleringsmekanisme for DnaA-konsentrasjonen i cella (Mott og Berger, 2007).

## 1.5 Påvisning av protein-protein interaksjon ved hjelp av gjær 2-hybrid teknologi.

Gjær 2-hybrid teknologien ble først beskrevet av Fields og Song i 1989 som en metode til å studere protein-protein interaksjoner (Fields og Song, 1989). Tidligere ble slike studier utført ved bl.a. kromatografiske metoder og koimmunopresipitasjon, metoder som krever rensset protein i høye konsentrasjoner (Topcu og Borden, 2000). Gjær 2-hybrid systemet er et in vivo system først utviklet i *Saccharomyces cerevisiae*. Prinsippet er at en interaksjon mellom to proteiner resulterer i uttrykk av et reporter-gen i gjær-cella og dette fører til en fenotypisk endring som lett lar seg monitorere (Topcu og Borden., 2000). Utgangspunktet er proteinet GAL4, en transkripsjonsaktivator med to distinkte funksjonelle domener (Fields og Song, 1989). Det aminoterminal domenet, aminosyre 1-147, bindes til spesifikke DNA-sekvenser, "upstream activating sequences"(UAS), og posisjonerer dermed GAL4 riktig i forhold til genet som skal aktiveres for transkripsjon. Dette domenet betegnes BD for bindende domene. Det karboksyterminale domenet, aminosyre 768-881, binder RNA polymerase II som dermed bringes i riktig posisjon for transkripsjonen. Dette domenet betegnes AD for aktiverende domene. Mellomstykket mellom BD og AD, aminosyre 148-767, opprettholder fysisk kontakt mellom BD og AD slik at GAL4 er aktiv. Hvis dette mellomstykket skiftes ut med noe som opprettholder den fysiske kontakten mellom BD og AD, vil det fortsatt foreligge en funksjonell aktiv transkripsjonsfaktor (Fields og Song, 1989). Denne egenskapen kan benyttes til å undersøke en eventuell interaksjon mellom to proteiner, protein X og protein Y. Det konstrueres da et fusjonsprotein som består av BD og protein X og et annet fusjonsprotein som består av AD og protein Y. En interaksjon mellom protein X og protein Y vil bringe BD og AD i fysisk kontakt og dermed gjenopprette en funksjonell aktiv transkripsjonsfaktor (Topcu og Borden, 2000). Når UAS for BD er plassert foran et hensiktsmessig reporter-gen, vil en interaksjon mellom protein X og protein Y gi uttrykk av reporter-genet. Protein fra dette genet vil gi en fenotypisk endring som enkelt lar seg monitorere (Topcu og Borden, 2000) (se fig.5 ).

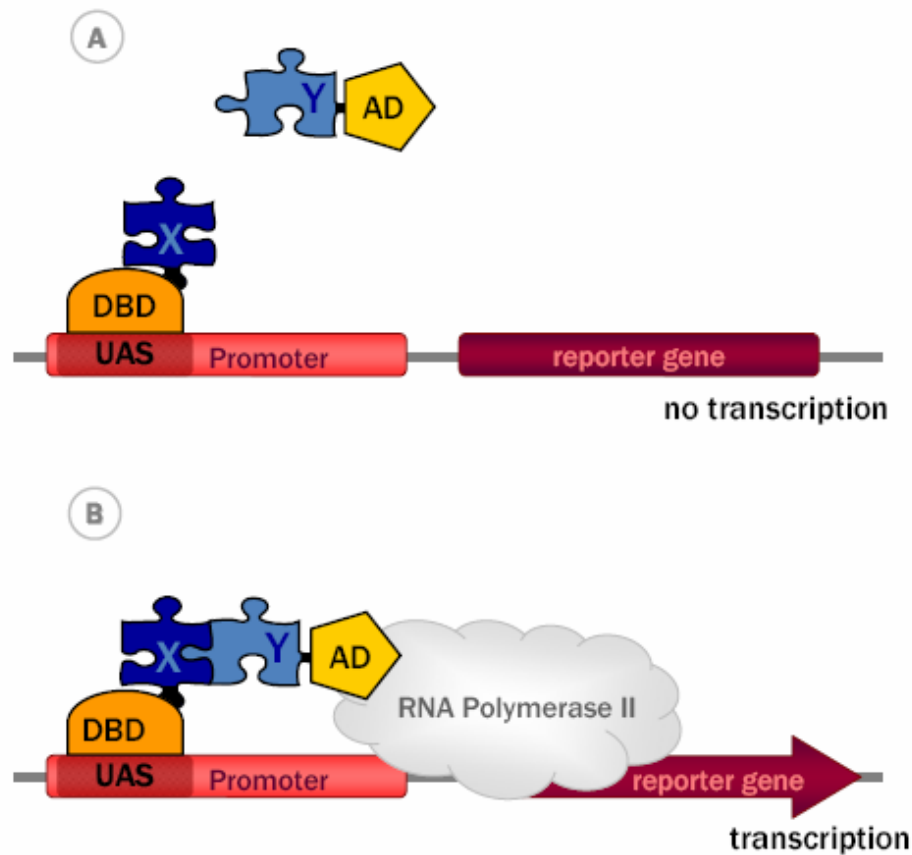


Fig.5

Skjematisk framstilling av gjær 2-hybrid systemet.

( Brückner et al., 2009).

("DBD" ="BD").

A: Ingen protein-protein interaksjon.

B: Protein-protein interaksjon.

Det opprinnelige reporter-genet var *lacZ* som koder for  $\beta$ -galaktosidase (Fields og Song, 1989). Monitoreringen utføres ved å tilsette X-gal til gjær-cellenes dyrkningsmedium,  $\beta$ -galaktosidase spalter den kjemiske forbindelsen X-gal og ett av sluttproduktene i reaksjonen er en uløselig forbindelse med sterk blåfarge og følgelig egnet for monitorering (Topcu og Borden, 2000). Ved å manipulere genomet til *Saccharomyces cerevisiae* kan nye gen bringes under transkripsjonell kontroll av den ovennevnte GAL4-konstruksjonen som er avhengig av interaksjon mellom de to testproteinene for funksjon ( Brückner et al., 2009). En mye brukt strategi er å bruke et gen som koder for et enzym i biosynteseveien til en forbindelse som er essensiell for gjær-cellenes vekst. Interaksjon mellom testproteinene er dermed nødvendig for at

vedkommende forbindelse skal kunne syntetiseres av gjærcella. Et vekstmedium som mangler denne forbindelse vil da selektere vekst til celler hvor interaksjonen har funnet sted og interaksjonen kan monitoreres ved vekst. Eksempler på slike reporter-genet med respektive biosyntese-produkt er: *leu2*-leucin, *his3*-histidin, *ade2*-adenin, *ura3*-uracil og *lys2*-lysin (Brückner et al., 2009).

En videreutvikling av gjær 2-hybrids-systemet bygger på reporter-genet *ura3* (Topcu og Borden, 2000). Dette genet koder for enzymet orotidin 5'-monofosfat dekarboksylase (ODCase) som katalyserer et trinn i biosyntese-veien til uridin og uracil (se fig.6 ).

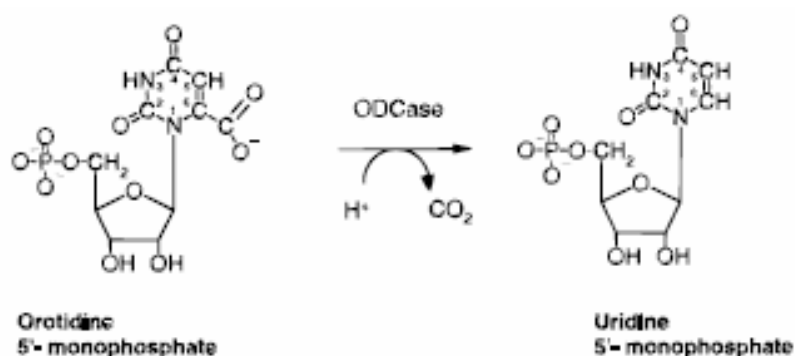


Fig.6

Reaksjon katalysert av ODCase.

([www.ihop-net.org](http://www.ihop-net.org))

En interaksjon mellom testproteinene i dette systemet vil dermed gi vekst i et medium som mangler uracil, dette betegnes positiv seleksjon. ODCase vil imidlertid også katalysere reaksjonen der 5-fluoroorotinsyre (5-FOA) omdannes til 5-fluorouracil (Topcu og Borden, 2000) (se fig.7 ).

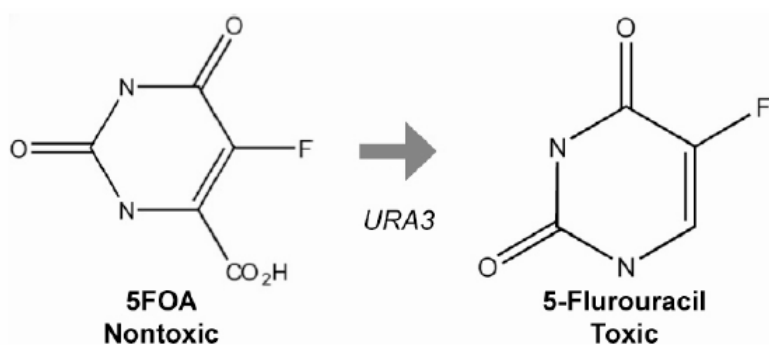


Fig.7

Reaksjon katalysert av ODCase.

(Product information, Zymo Research)



5-fluorouracil har i lang tid vært brukt i humanmedisinen som et cytostatikum og den er også toksisk for gjærceller (Boeke et al., 1987). I et medium tilsatt 5-fluoroorotinsyre vil derfor en interaksjon mellom testproteinene gi syntese av 5-fluorouracil og dermed celledød, dette betegnes negativ seleksjon (Topcu og Borden, 2000). Vanligvis vil det være ønskelig med positiv seleksjon da mangel på vekst kan ha helt andre årsaker enn den funksjonen som undersøkes (Fossum et al., 2008).

Når en interaksjon mellom to proteiner er vist ved et gjær 2-hybrid system, kan det i visse tilfeller være interessant å finne forbindelser som bryter denne interaksjonen. Eksempelvis kan bryting av en protein-protein interaksjon være en virkningsmekanisme for potensielle nye legemidler (Topcu og Borden, 2000). Interaksjon mellom DnaA-molekyler er som beskrevet ovenfor en forutsetning for initiering av DNA-replikasjonen i bakterier og en forbindelse som bryter denne interaksjon vil derfor kunne ha interesse ved utviklingen av nye antibakterielle legemidler (Fossum et al., 2008). Et søk etter forbindelser som bryter en aktuell protein-protein interaksjon kan gjennomføres ved at mulige kandidater tilsettes i et medium som inneholder 5-fluoroorotinsyre. Forbindelser som bryter protein-protein interaksjonen vil da hindre at det dannes 5-fluorouracil og dermed vil gjærcellene "reddes" og vise vekst (Topcu og Borden, 2000). Dette gir altså en positiv seleksjon på forbindelser som bryter interaksjonen og positiv seleksjon er som tidligere nevnt gunstig.

Konstruksjonen av de ovennevnte fusjonsproteinene BD-protein X og AD-protein Y innledes ved at DNA-sekvensen som koder for proteinet som ønskes undersøkt blir mangfoldiggjort ved hjelp av PCR (polymerase chain reaction) teknologi (se 2.1). "Protein" kan være et fullstendig fysiologisk protein eller en del av dette som formidler interaksjonen som ønskes undersøkt. PCR-produktet behandles deretter med restriksjonsenzymmer som kutter DNA-dobbeltråden slik at hver ende av det nye produktet får et lite overheng med noen få frie nukleotider som ikke er bundet til et komplementært nukleotid (se 2.3). Dette produktet skal nå klones inn i et plasmid, og dette plasmidet behandles først med de samme restriksjonsenzymene som ble brukt på det opprinnelige PCR-produktet. Plasmidet åpnes dermed opp og endene får frie

overheng slik som det kuttete PCR-produktet har. Mange restriksjonsenzymmer kutter i en palindromisk sekvens på dobbelttrådet DNA, d.v.s. en sekvens som er symmetrisk slik at øvre tråd lest fra 5' - mot 3'-ende har samme baserekkefølge som nedre tråd lest fra 5' - mot 3'-ende. Dette medfører at det kuttete PCR-produktet og det kuttete plasmidet nå har komplementære frie nukleotider på sine ender. Disse nukleotidene kan bindes til hverandre slik at PCR-produktet blir et innskudd i plasmidet. DNA-ligase katalyserer dannelsen av de fire manglende esterbindingene i DNA-ryggraden og dermed er det nye plasmidet komplett uten kjedebrudd. To ulike typer plasmider brukes, den ene typen inneholder DNA-sekvensen for BD og setter for restriksjonsenzymmer som gjør at innskuddet plasseres på en slik måte at plasmidet får en DNA-sekvens som koder for BD-protein X, mens den andre typen plasmid vil få en sekvens som koder for AD-protein Y. De to ulike plasmidene transformeres så inn i en gjærceelle, vanligvis ved hjelp av litiumacetat. En konstitutiv aktiv promotor på plasmidene gjør at de to fusjonsproteinene BD-protein X og AD-protein Y uttrykkes i gjærceella og et gjær 2-hybrid system er etablert. Hvis man ønsker å undersøke interaksjoner mellom to molekyler av samme protein (f.eks. to molekyler DnaA) gjelder samme resonnerment som over med den forutsetning at "protein X" og "protein Y" da er benevnelser på det samme proteinet (Topcu og Borden, 2000).

Gjær 2-hybrid teknologien er blitt meget populær da den ikke krever avansert og kostbart utstyr og lett lar seg oppskalere (Brückner et al., 2009). Teknologien kan brukes til å vise interaksjon mellom kjente veldefinerte protein eller et helt genomisk bibliotek kan brukes til dannelsen av konstrukter som kan screenes for interaksjoner (Brückner et al., 2009). De første forsøk på å konstruere et interaktom, d.v.s. et fullstendig nettverk over alle molekyllære interaksjoner i en art, er gjort med denne teknikken (Kiemer og Cesareni, 2007). Teknologien som beskrevet ovenfor har imidlertid visse begrensninger. Proteinene som skal testes må kunne penetrere kjernemembranen i gjærceella da interaksjonen skal aktivere reportergen på gjærgenomet. Plasmidene som brukes utstyrrer derfor fusjonsproteinene med NLS ("nuclear localization signal"), men riktig plassering i kjernen kan likevel være vanskelig særlig for protein som fysiologisk er integrert i membraner ved hjelp av hydrofobe domener (Topcu og Borden, 2000). For å kunne teste interaksjoner med proteiner som ikke lar seg lokalisere til kjernen er det utviklet nye varianter av gjær 2-hybrid systemer (Brückner et al., 2009). Disse systemene tester proteininteraksjoner i

cytosol eller ved membraner. Prinsippet er fortsatt at to ulike moduler er koplet til hvert av proteinene som skal testes og at interaksjon mellom proteinene fører modulene fysisk sammen slik at det dannes en biologisk aktiv enhet. Denne er ikke en transkripsjonsfaktor som i den klassiske utgaven av systemet, men kan eksempelvis være en deltager i en signaleringsbane ("Ras recruitment system") eller en funksjonell ubiquitin-enhet som tillater avspalting av et reporterprotein ("Split-ubiquitin system") (Brückner et.al., 2009).

I den klassiske utgaven av systemet vil proteiner som selv stimulerer transkripsjon ikke kunne testes (Brückner et al., 2009). Dette gjelder selvsagt kjente transkripsjonsfaktorer, men ethvert nytt konstrukt som skal brukes i systemet må testes for såkalt autoaktivering. Dette gjøres ved at gjærceller transformeres med kun en type plasmid og dermed uttrykker kun ett konstrukt, enten BD-protein X eller AD-protein Y. Hvis en slik gjærcelle viser aktivering av reportergenet foreligger det autoaktivering. Når det foreligger et slikt problem, kan bruk av en systemvariant som ikke benytter transkripsjonell aktivering være en løsning (Brückner et al., 2009). Utgangspunktet for bruk av gjær 2-hybrid systemet er at interaksjoner som vises i dette systemet også vil være aktive i proteinenes fysiologiske miljø i den organismen som undersøkes. Dette stemmer imidlertid ikke alltid, proteinene som viser interaksjon i gjær 2-hybrid systemet kan i sin fysiologiske tilstand være forhindret fra kolokalisering f.eks. ved at de er allokert til ulike celleorganeller. Kolokalisering i cella kan undersøkes ved antistoffer merket med en forbindelse som viser fluorescens (Brückner et al., 2009). Ikke alle fysiologisk aktive interaksjoner vil vises i gjær 2-hybrid systemet. Posttranslasjonelle modifikasjoner på proteinene kan være avgjørende for om interaksjon finner sted. Ulikheter i enzymutrustningen mellom gjær og høyere eukaryote organismer gjør at visse modifikasjoner enten ikke finner sted eller er annerledes i gjær (Topcu og Borden, 2000). En løsning på dette problemet er å konstruere gjærstammer som uttrykker de nødvendige enzymene (Brückner et al, 2009). Forbindelser som skal screenes for brytning av en protein-protein interaksjon må kunne penetrere gjærcellas vegg og plasmamembran. For å øke spekteret av stoffer som kan penetrere er det gjort genetiske endringer i gjærstammer. Det er også brukt kjemiske midler f.eks. polymyxin B (Topcu og Borden, 2000).

## 1.6 Hensikt med oppgaven

Homooligomeriseringen av DnaA er en forutsetning for initiering av DNA-replikasjon (Mott og Berger, 2007). Bakteriell DnaA er svært forskjellig fra sitt funksjonelle motstykke i humane celler (Mott og Berger, 2007). Hemming av DnaA-homooligomerisering er dermed en mulig virkningsmekanisme for nye antibakterielle legemidler (Fossum et al., 2008). Da homooligomeriseringen medieres av motiver på domene I og domene III (Messer et al., 2001), vil en screeningtest for kjemiske forbindelser som bryter interaksjon mellom to DnaA-molekyler, måtte inkludere minst ett av disse domenene.

Mulige kandidater for bruk i en screeningtest vil da være:

- Hele DnaA-molekylet, aminosyre 1-467, DnaA
- Domene I, aminosyre 1-86, DnaA (1-86)
- Domene I-III, aminosyre 1-373, DnaA(1-373)

En forutsetning for bruk av disse kandidatene er at henholdsvis DnaA-DnaA interaksjon, DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjon og DnaA(1-373)-DnaA(1-373) interaksjon lar seg påvise ved bruk av gjær 2-hybrid teknikk. DnaA-DnaA interaksjonen er tidligere forsøkt testet ved denne teknikken, men konstruktene BD-DnaA og AD-DnaA viste seg å være toksiske for gjærcellene (Line Johnsen, personlig meddelelse). Domene IV, aminosyre 374-467, inneholder motivene som medierer DnaAs binding til DNA (Messer et al., 1999). Det er derfor mulig at den observerte toksisitet skyldes uspesifikk binding mellom domene IV og gjærcellas DNA slik at replikasjon eller transkripsjon hemmes. DnaA(1-86) og DnaA(1-373) inneholder ikke domene IV og vil derfor ikke virke toksisk på gjærcellene ved denne tentative mekanismen. Hensikten med denne oppgaven er å undersøke om interaksjonen DnaA(1-86)-DnaA(1-86) og /eller interaksjonen DnaA(1-373)-DnaA(1-373) lar seg påvise ved bruk av gjær 2-hybrid teknikk.

## 2. Materiale og metoder.

### 2.1 Polymerase chain reaction (PCR).

PCR er en metode som brukes til å mangfoldiggjøre en spesifikk DNA-sekvens in vitro. Utgangspunktet er dobbeltrådet DNA som inneholder den ønskede sekvensen. Ved bruk av genomisk DNA kan gener eller definerte deler av gener mangfoldiggjøres som isolerte DNA-dobeltråder. Konsentrasjonen av ønsket sekvens kan enkelt økes en milliard ganger (Albert et al., 2002). Det konstrueres to oligonukleotider med kjemiske metoder. Disse virker som primere og definerer det området som skal mangfoldiggjøres. For å illustrere tas det utgangspunkt i følgende stiliserte situasjon; en øvre tråd ligger med retningen  $5' \rightarrow 3'$  mot høyre, den komplementære nedre tråden har følgelig retningen  $5' \rightarrow 3'$  mot venstre. En primer er da identisk med sekvensen  $5' \rightarrow 3'$  på øvre tråd fra starten av ønsket område, den andre primeren er identisk med sekvensen  $5' \rightarrow 3'$  på nedre tråd fra slutten av ønsket område (Alberts et al., 2002). Primerne inneholder normal 30-35 nukleotider.

Dobeltrådet DNA spaltes til to enkelttråder ved oppvarming til ca.  $95^{\circ}\text{C}$ , deretter avkjøles reaksjonsblanding til en temperatur  $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$  som er slik at primerne bindes til sine komplementære sekvenser på enkelttrådet DNA. En DNA-polymerase kan nå bruke primeren til å initiere syntese av en ny DNA-tråd med enkelttrådet DNA som templat slik at det dannes områder med dobbeltrådet DNA på den opprinnelige enkelttråden. Nydanna dobbeltrådet DNA vil nå alltid inneholde den sekvensen som skal mangfoldiggjøres. Temperaturen blir så igjen hevet slik at dobbeltrådet DNA spaltes til enkelttråder, og deretter senket slik at primerne på nytt kan bindes til sine komplementære sekvenser, også til de som finnes på tråder som ble syntetisert i forrige runde. Den samme syklusen gjentas så totalt 20-30 ganger slik at den ønskede sekvensen mangfoldiggjøres til ønsket antall. Dobeltrådet DNA vil nå bestå av kun den ønskede sekvensen, andelen av lengre fragmenter vil være helt neglisjerbar. Som en illustrasjon har 8 av 16 DNA-tråder som er dannet etter 3 sykler riktig lengde, etter ytterligere 4 sykler har 240 av 256 riktig lengde (Alberts et al., 2002).

DNA-polymerasen som brukes ved PCR må tåle den høye temperaturen uten å denaturere og bli inaktiv. Det brukes derfor DNA-polymeraser som er isolert fra

termofile bakterier. I de tidligste utgavene av metoden ble andre DNA-polymeraser benyttet og det måtte tilsettes nytt enzym for hver syklus noe som gjorde metoden mindre attraktiv. En reaksjonsblanding for PCR må inneholde en buffer, DNA som skal mangfoldiggjøres, to primere, en termostabil DNA-polymerase samt de fire deoksyribonukleosid trifosfatene dATP, dGTP, dCTP og dTTP (Alberts et al., 2002). Reaksjonen foregår i et apparat som kan gi svært raske temperaturendringer og hvor program for temperaturer og varighet kan legges inn.

I denne oppgaven ble følgende protokoller brukt:

### 2.1.1 PCR-protokoll 1:

Reaksjonsblanding:

Nukleasefritt vann	162 µl
10x Pfu Ultra Reaction Buffer	20 µl
dNTP mix (25 mM each dNTP)	2 µl
Genomisk DNA fra <i>E.coli</i> (100 ng/ µl)	4 µl
Primer DnaA(1-86)fw. (10 µM)	4 µl
Primer DnaA(1-86)rev. (10 µM)	4 µl
Pfu Ultra II fusion HS DNA polymerase	4 µl

Genomisk DNA fra *E.coli* er rensset i henhold til protokoll (2.1.3).

Program:

PTC-100 Programmable Thermal Controller

(timer:minutter:sekunder)

1. 95°C 0:02:00
2. 95°C 0:00:20
3. 55°C 0:00:20
4. 72°C 0:00:15
5. go to 2. 29 times
6. 72°C 0:03:00
7. 4°C ∞

### 2.1.2 PCR-protokoll 2:

Reaksjonsblanding:

Nukleasefritt vann	162 µl
10x Pfu Ultra Reaction Buffer	20 µl
dNTP mix (25 mM each dNTP)	2 µl
Genomisk DNA fra <i>E.coli</i> (100 ng/ µl)	4 µl
Primer DnaA(1-86)fw. (10 µM)	4 µl
Primer DnaA(1-373)rev. (10 µM)	4 µl
Pfu Ultra II fusion HS DNA polymerase	4 µl

Genomisk DNA fra *E.coli* er renset i henhold til protokoll (2.1.3 ).

Program:

PTC-100 Programmable Thermal Controller

(timer::minutter:sekunder)

1. 95°C 0:02:00
2. 95°C 0:00:20
3. 56°C 0:00:20
4. 72°C 0:00:25
5. go to 2. 29 times
6. 72°C 0:03:00
7. 4°C ∞

### 2.1.3 Protokoll for rensing av genomisk DNA fra *E.coli*:

*E.coli* CM735, villtype, ble tatt fra -80°C og dyrket i LB-medium over natt under rysting. Cellene ble så senfrifugert ned til en pellet (16 400 r.p.m., 4 min).

Til rensingen ble det brukt ”Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega).

Protokoll (Promega):

1. Cellepelleten løses i 600 µl ”Nuclei Lysis Solution”.
2. Blandingen inkuberes 5 min. ved 80°C og avkjøles til romtemperatur.
3. Det tilsettes 3 µl ”RNase Solution” og blandes.

Blandingen inkuberes ved 37°C i 45 min. og avkjøles til romtemperatur.

4. Det tilsettes 200 µl "Protein Precipitation Solution" og blandes på vortexer.
5. Blandingen inkuberes på is i 5 min..
6. Blandingen sentrifugeres 16400 r.p.m. i 5 min..
7. Supernatanten overføres til et rent rør med 600 µl isopropanol. Det blandes ved invertering.
8. Blandingen sentrifugeres 16400 r.p.m. i 5 min..
9. Supernatanten suges av og det tilsettes 600 µl 70% etanol. Det blandes ved kraftig rysting.
10. Blandingen sentrifugeres 16400 r.p.m. i 5 min..
11. Supernatanten suges av. Pelleten lufttørkes i 40 min..
12. Pelleten løses i 50 µl "DNA Rehydration Solution".

## 2.2 Gelelektroforese.

Gelelektroforese er en metode som kan separere DNA-fragmenter med ulik lengde. Prinsippet er at DNA-fragmentene som er negativt ladet beveges gjennom en gel ved hjelp av et pålagt elektrisk felt. DNA-fragmentene må bevege seg gjennom porene i gelen og små fragmenter vil møte mindre mekanisk motstand enn store fragmenter og de små fragmentene vil følgelig bevege seg lengre i gelen i løpet av en viss tid (Alberts et al., 2002). Størrelsen på ukjente DNA-fragmenter kan bestemmes ved at de kjøres i samme gel som en standard som inneholder fragmenter med kjent størrelse. Standarden gir et fast mønster av bånd på gelen hvor de minste fragmentene har beveget seg lengst. Størrelsen av et ukjent fragment kan dermed leses av gelen ved å sammenlikne plasseringen av båndet fra vedkommende fragment med plasseringen av standardens bånd (Alberts et al., 2002). I denne oppgaven ble det brukt geler av 0,8% agarose i 0,5x TBE-buffert (se appendiks). Elektrolytter er nødvendige for at gelen skal kunne lede elektrisk strøm. Agarose er et polysakkarid som isoleres fra alger og tynne løsninger av dette gir en gel med porestørrelse som er egnet til separasjon av dobbelttrådet DNA i størrelsesområdet 300-10.000 nukleotidepar (Alberts et al., 2002). Elektroforesen utføres ved at gelen plasseres i et spesielt kar som er fylt med buffer slik at væska dekker gelen. Prøvene appliseres i brønner i gelen ved hjelp av en "lastebuffer" som bl.a. inneholder glyserol som gjør at



prøven synker ned i brønnen og ikke diffunderer ut i væsken, og fargestoffet bromfenolblått hvis vandring i gelen kan følges visuelt. En strømkilde koples til karet og det legges en elektrisk spenning mellom karetets to ender. Spenning og kjøretid tilpasses de fragmentene som skal separeres. Etter at kjøringen er avsluttet legges gelen i en løsning av etidiumbromid. Denne forbindelsen interkalerer i DNA-heliksen og viser fluorescens etter UV-bestråling slik at DNA-fragmentene visualiseres. Ved preparativt arbeid skjæres gelbiter som inneholder det ønskede DNA-fragment ut av gelen under UV-bestråling.

### 2.2.1 Gelelektroforeseprotokoll:

1. 60 ml 0,5x TBE-buffer (se appendiks) tilsettes 0,48 g agarose. Blandingen varmes opp til koking i mikrobølgeovn inntil den er partikkelfri.
2. Løsningen helles i en støpeform forsynt med en kam og plassert i en støperenne og står ved romtemperatur til den er størknet.
3. Støpeformen tas ut av støperennen, kammen fjernes og formen plasseres i et elektroforesekaret som inneholder 0,5x TBE-buffer slik at gelen dekkes av væske.
4. 5 deler prøve tilsettes 1 del 6x loading dye blue.
5. Standarden lages fra 1 del 6x loading dye blue, 1 del 2 log ladder og 4 deler nukleasefritt vann.
6. Standarden appliseres i den venstre brønnen og prøvene appliseres i rekkefølge i ledige brønner fra venstre mot høyre.
7. Strømkilden koples til elektroforesekaret og spenningen settes til 100 V.
8. Strømkilden koples fra og elektroforesen stanses etter mellom 1,5 og 2,5 time.
9. Gelen tas ut av formen og legges i en løsning av 100 ml destillert vann + 10 µl 1% etidiumbromid.
10. Gelen tas ut av løsningen etter 30 min..
11. DNA-fragmentenes plassering visualiseres ved UV-bestråling og fotograferes med GenSnap-systemet.
12. Ved preparativt arbeid skjæres de ønskede gelbiter ut under UV-bestråling.

### 2.2.2 Protokoll for rensing av DNA-fragmenter fra gel.

Det brukes “Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System” (Promega).

Protokoll (Promega):

1. Det tilsettes “Membran Binding Solution” til gelen, 10 µl pr. 10 mg gel.
2. Gelen løses opp ved 60°C i inntil 10 min.. Det blandes kortvarig på vortexer 2 ganger under denne prosessen.
3. Løsningen fylles på kolonnen plassert i oppsamlingsrøret og henses ved romtemperatur i 1 min..
4. Det sentrifugeres 16400 r.p.m. i 1 min. og gjennomløpet kastes.
5. Kolonnen tilsettes 700 µl ”Membrane Wash Solution”.
6. Det sentrifugeres 16400 r.p.m. i 1 min. og gjennomløpet kastes.
7. Kolonnen tilsettes 500 µl “Membrane Wash Solution”.
8. Det sentrifugeres 16400 r.p.m. i 5 min. og gjennomløpet kastes.
9. Det sentrifugeres 16400 r.p.m. i 1 min. og oppsamlingsrøret kastes.
10. Kolonnen overføres til et rent rør, tilsettes 30 µl nukleasefritt vann og inkuberes ved romtemperatur i 1 min..
11. Det sentrifugeres 16400 r.p.m. i 1 min..
12. Eluatet lagres ved -20°C.

### 2.3 Spesifikk kutting av dobbelttrådet DNA med restriksjonsenzym.

Restriksjonsenzym er nukleaser som kutter dobbelttrådet DNA på seter med en sekvens som er helt spesifikk for det enkelte enzym. Slike enzymer kan isoleres fra en rekke ulike bakteriearter og svært mange finnes nå kommersielt tilgjengelig.

I bakteriene beskytter disse enzymer mot fremmed DNA mens bakteriens eget DNA ikke kuttes da kuttasetene i bakteriens eget genom er metylert og dermed ikke lenger substrat for bakteriens egne restriksjonsenzym (Alberts et al., 2002). De spesifikke kuttasetene består av 4-8 komplementære nukleotider i dobbelttråden. Setene har ofte en palindromisk oppbygging d.v.s. at sekvensen lest 5' → 3' i den ene tråden er den samme som sekvensen lest 5' → 3' i den andre tråden. Mange av restriksjonsenzymene kutter ikke enkeltrådene i bindinger som ligger rett overfor hverandre, men i bindinger med noe avstand slik at hver ende av den nykuttete

dobbeltråden får et overheng med enkelttrådet DNA. Disse overhengene kalles kohesive ender og to ender som er kuttet med det samme restriksjonsenzymet vil være komplementære og de kan dermed bindes til hverandre. Slik kan ulike DNA-moduler lett skjøtes sammen så lenge de er kuttet med det samme restriksjonsenzymet. Enzymet DNA-ligase kan så katalysere dannelsen av de to manglende esterbindingene i DNA-trådene og en fullstendig DNA-dobbeltråd er dannet (Alberts et al., 2002).

I denne oppgaven brukes restriksjonsenzymene NdeI og BamHI (protokoll 1, se 2.3.1). NdeI ble opprinnelig isolert fra *Neisseria denitrificans* og har følgende spesifikke kuttesete:



BamHI ble opprinnelig isolert fra *Bacillus amyloliquefaciens* og har følgende spesifikke kuttesete:



I de siste forsøkene i denne oppgaven ble BamHI-HF benyttet. Dette enzymet viser liten uspesifikk aktivitet, men det binder DNA så sterkt at denne interaksjon må brytes med SDS før elektroforese av produktet (Produktinformasjon, New England Biolabs). En annen protokoll (protokoll 2 for kutting av DNA med restriksjonsenzymmer, se 2.3.2) ble derfor brukt.

### 2.3.1 Protokoll 1 for kutting av DNA med restriksjonsenzymmer:

1. DNA-løsning med konsentrasjon ca. 200 ng/μl	14 μl
2. NEBuffer 3	2 μl
3. Bovine Serum Albumin (BSA) 10 mg/ml	2 μl
4. NdeI 20000 units/ml	1 μl
5. BamHI 20000 units/ml	1 μl

1.-4. blandes i rekkefølge og inkuberes ved 37°C i 1 time, deretter tilsettes 5. og blandingen inkuberes ved 37°C i ytterligere 1 time og 30 min..

### 2.3.2 Protokoll 2 for kutting av DNA med restriksjonsenzymmer:

1. DNA-løsning med konsentrasjon ca. 200 ng/μl	14 μl
2. NEBuffer 4	2 μl
3. Nukleasefritt vann	2 μl
4. NdeI 20000 units/ml	1 μl
5. BamHI-HF 20000 units/ml	1 μl

1.-5. blandes i rekkefølge og inkuberes ved 37°C i 2 timer.

Før gelelektroforese tilsettes 5 μl 10% SDS-løsning (=natriumdodekylsulfat-løsning).

### 2.3.3 Protokoll for ligering av innskudd i plasmid:

1. T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10X)	2 μl
2. Kuttet plasmid i løsning	
3. Kuttet DNA for innskudd i løsning	
4. T4 DNA Ligase 400000 units/ml	1 μl

Det molare forholdet mellom ”DNA for innskudd” og ”plasmid” skal være tilnærmet lik 6. Konsentrasjonene i løsning 2 og løsning 3 skal være slik at totalvolumet av reaksjonsblandingen blir 20 μl og totalkonsentrasjonen av DNA i reaksjonsblandingen blir under 10 ng/μl. 1.-4. blandes i rekkefølge og inkuberes ved 37°C i 1 time og deretter ved 16°C over natt. Reaksjonsblandingen betegnes nå ”ligmix”.

## 2.4. Protokoll for transformering av plasmid til XL10-Gold

ultrakompetente celler (Stratagene):

1. 1 ml LB-medium (se appendiks) varmes til 42°C.
2. Et eppendorfrør avkjøles på is.
3. Suspensjonen av XL10-Gold celler tines på is.
4. 100 µl cellesuspensjon overføres til avkjølt eppendorfrør.
5. 4 µl β-mercaptoethanol mix tilsettes. Blandingen virvles raskt i bordsentrifuge.
6. Blandingen inkuberes på is i 10 min.. I denne tiden virvles den raskt i bordsentrifuge hvert 2. min..
7. Det tilsettes 3 µl ligmix og blandingen virvles raskt i bordsentrifuge.
8. Blandingen inkuberes på is i 30 min..
9. Blandingen overføres til varmeblokk på 42°C i nøyaktig 30 sek..
10. Blandingen inkuberes på is i 2 min..
11. Det tilsettes 0,9 ml LB-medium som er forhåndsoppvarmet til 42°C.
12. Blandingen inkuberes ved 37°C med rysting 300 r.p.m. i 1 time.
13. 200µl av blandingen strykes ut på LB-agar (se appendiks) tilsatt de funksjonelle antibiotika.
14. Resten av blandingen sentrifugeres 16400 r.p.m. i 5 min.. Supernatanten kastes og cellepelletten løses i 200 µl LB-medium.
15. De 200 µl fra pkt.14 strykes ut på LB-agar tilsatt de funksjonelle antibiotika.
16. Agarskålene inkuberes ved 37°C over natt.

## 2.5 Protokoll 1 for rensing av plasmid:

Det brukes ” Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega).

Cellesuspensjonen sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 5min. og supernatanten suges av.

Protokoll (Promega):

1. Cellepelletten resuspenderes i 250 µl ”Cell Resuspention Solution”.
2. Det tilsettes 250 µl ”Cell Lysis Solution”. Røret snus 4 ganger for blanding.
4. Det tilsettes 10 µl ”Alkaline Protease Solution”. Røret snus 4 ganger for blanding.
5. Blandingen inkuberes ved romtemperatur i 5 min..
6. Det tilsettes 350 µl ”Neutralization Solution”. Røret snus 4 ganger for blanding.
7. Blandingen sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 10 min..

8. Supernatanten dekanteres over på kolonnen og sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 1 min.. Gjennomløpet kastes.
9. Kolonnen tilsettes 750 µl "Membran Wash Solution" og sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 1 min.. Gjennomløpet kastes.
10. Kolonnen tilsettes 250 µl "Membran Wash Solution" og sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 1 min.. Gjennomløpet kastes.
11. Kolonnen sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 2 min..
12. Kolonnen overføres til et rent rør, tilsettes 30 µl nukleasefritt vann og sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 1 min..
13. Eluatet lagres ved -20°C.

## 2.6 Protokoll 2 for rensing av plasmid:

Det brukes "JETSTAR Plasmid Purification MIDI Kit" (Genomed).

Protokoll (Genomed):

1. Kolonnen tilsettes 10 ml "Solution E4". Løsningen renner gjennom kolonnen.
2. Cellesuspensjonen sentrifugeres ved 8500 r.p.m. i 10 min.. All supernatant fjernes.
3. Cellepelletten suspenderes i 4,0 ml "Solution E1".
4. Det tilsettes 4,0 ml "Solution E2" og blandes ved invertering inntil lysatet virker homogent.
5. Blandingen inkuberes ved romtemperatur i 5 min..
6. Det tilsettes 4,0 ml "Solution E3" og blandes ved invertering inntil all gelatinøs masse er borte.
7. Blandingen sentrifugeres ved 8500 r.p.m. i 10 min..
8. Supernatanten overføres til kolonnen. Løsningen renner gjennom kolonnen.
9. Kolonnen tilsettes 10,0 ml "Solution E5". Løsningen renner gjennom kolonnen.
10. Kolonnen tilsettes 10,0 ml "Solution E5". Løsningen renner gjennom kolonnen.
11. Kolonnen tilsettes 5,0 ml "Solution E6". Løsningen renner gjennom kolonnen.
12. Gjennomløpet fra pkt.11 tilsettes 3,5 ml isopropanol.
13. Blandingen sentrifugeres ved 4°C og 8500 r.p.m. i 30 min.. Supernatanten fjernes.
14. Pelletten vaskes med 3,5 ml 70% etanol.
15. Blandingen sentrifugeres ved 4°C og 8500 r.p.m. i 30 min.. Etanolen suges av.
16. Pelletten lufttørkes i 30 min..
17. Pelletten løses i 100 µl nukleasefritt vann.

## 2.7 Plasmider

### pGBKT7 (Clontech)

(Vector Information; Clontech)

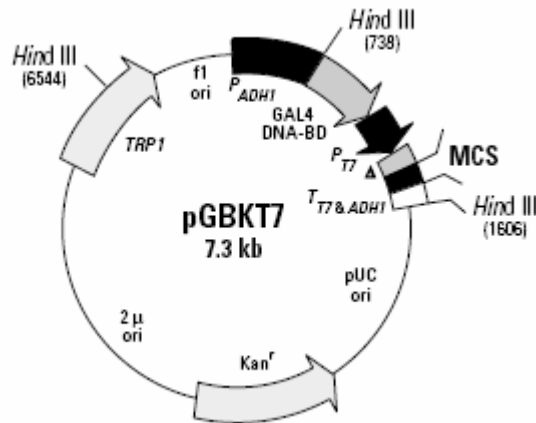


Fig.8

Plasmidet pGBKT7

Dette plasmidet (se fig.8) inneholder en DNA-sekvens som koder for GAL4 aminosyre 1-147 altså det DNA bindende domenet (BD) (se 1.5). Plasmidet er videre utstyrt med en MCS ("multiple cloning site") som inneholder spesifikke kuttsteder for flere ulike restriksjonsenzymmer bl.a. *Nde*I og *Bam*HI. Dette gjør det mulig å klonere inn DNA-fragment som koder for proteiner eller proteindomener som skal testes for protein-protein interaksjoner i et gjær 2-hybrid system. Et fusjonsprotein mellom BD og vedkommende testprotein kan dermed transkriberes fra plasmidet. Foran BD-sekvensen er det plassert en konstitutiv promotor, *ADH 1*, og denne sikrer at fusjonsproteinet uttrykkes på et høyt nivå. pGBKT7 er et "skyttelplasmid" som kan replikeres i både *Escherichia coli* med replikasjonsinitiering i *pUC ori* og i *Saccharomyces cerevisiae* med replikasjonsinitiering i *2 μ ori*. Plasmidet inneholder videre et gen for kanamycin-resistens og dette gjør det mulig å selekttere bakterier som inneholder plasmidet, for vekst. *trp1*-genet koder for et enzym i biosynteseveien til tryptofan og gjærceller som inneholder plasmidet kan derfor selekteres for vekst på medier som ikke inneholder tryptofan.

## pGADT7 (Clontech)

(Vector Information; Clontech)

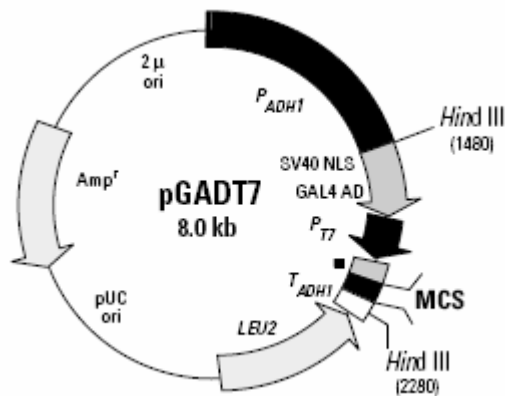


Fig.9

Plasmidet pGADT7

Dette plasmidet (se fig.9) inneholder en DNA-sekvens som koder for GAL4 aminosyre 768-881 altså det aktiverende domenet (AD) (se 1.5). Plasmidet er videre utstyrt med MCS (multiple cloning site) som inneholder spesifikke kutteseter for flere ulike restriksjonsemzymer bl.a NdeI og BamHI. Dette gjør det mulig å klonne inn DNA-fragment som koder for proteiner eller proteindomener som skal testes for protein-protein interaksjoner i et gjær 2-hybrid system. Et fusjonsprotein mellom AD og vedkommende testprotein kan dermed transkriberes fra plasmidet. Foran AD-sekvensen er det plassert en konstitutiv promotor, ADH 1, og denne sikrer at fusjonsproteinet uttrykkes på et høyt nivå. pGADT7 er et ”skyttelplasmid” som kan replikeres i både *Escherichia coli* med replikasjonsinitiering i pUC ori og i *Saccharomyces cerevisiae* med replikasjonsinitiering i 2μ ori. Plasmidet inneholder videre et gen for ampicillin-resistens og dette gjør det mulig å selektere bakterier som inneholder plasmidet, for vekst. *leu2*-genet koder for et nødvendig enzym i biosynteseveien for leucin og gjærceller som inneholder plasmidet kan derfor selekteres for vekst på medier som ikke inneholder leucin.



## 2.8 Gjærstamme AH 109

(Produktinformasjon; Clontec)

Denne gjærstammen kan ikke syntetisere leucin, tryptofan, histidin og adenin.

Vekstmedier for dyrking av denne stammen må derfor inneholde disse forbindelsene for å gi vekst. AH 109 er utstyrt med fire reportergen som bare uttrykkes i nærvær av protein-protein interaksjoner mellom proteiner uttrykt i konstrukter med henholdsvis GAL4-BD og GAL4-AD (se 1.5).

Reportergenene er:

- *ade2* som koder for det manglende enzymet i biosynteseveien for adenin. Uttrykk av genet gir vekst i fravær av adenin i mediet.
- *his3* som koder for det manglende enzymet i biosynteseveien for histidin. Uttrykk av genet gir vekst i fravær av histidin i mediet.
- *lacZ* som koder for  $\beta$ -galaktosidase. Uttrykk av genet kan vises med en reaksjon som gir et sterkt farget produkt (se 1.5).
- *mell* som koder for  $\alpha$ -galaktosidase. Uttrykk av genet kan vises med en reaksjon som gir et sterkt farget produkt.

### 2.8.1 Protokoll for transformering av plasmider til AH 109 gjærceller (Clontech):

1. 100  $\mu$ l "one step buffer" (se 2.8.2) blandes med 10  $\mu$ l steril 1 M ditiotreitol (DTT).
2. Tre gjærkolonier fra YPD-agar (se appendiks) suspenderes i løsningen og det blandes med vortexer.
3. Løsninger av pGBKT7 og pGADT7 blandes slik at totalmassen av plasmid blir ca. 1  $\mu$ g og totalvolumet av løsningen blir mindre enn 9  $\mu$ l. pGBKT7 skal være i molart overskudd. Det tilsettes deretter 1  $\mu$ l "Herring Testes Carrier DNA 10 mg/ml" (Clontech).
4. Suspensjonen fra pkt.2 blandes til løsningen fra pkt.3 og det blandes med vortexer.
5. Blanding inkuberes ved 45°C i 30 min..
6. Gjærcellene spres på Seleksjonsagar 1 (se 2.9) og inkuberes ved 30°C i 3 døgn.

## 2.8.2 Protokoll for tillaging av "one-step buffer".

(Clontech):

40 g PEG 3350 tilsettes

20 ml Litiumacetat 1M (pH 7,5)

Noe vann tilsettes og det løses opp under omrøring.

Det tilsettes vann til 100 ml.

Løsningen steriliseres ved å varme opp til 65°C i 30 min. 3 ganger (en gang pr.dag, løsningen holdes ved romtemperatur mellom hver oppvarming).

Løsningen lagres ved 4°C.

## 2.9 Seleksjonsmedium og seleksjonsagar.

AH 109 celler som har fått transformert inn både pGBKT7 og pGADT7 vil vokse på medier som ikke inneholder tryptofan og leucin (f.eks. "seleksjonsmedium 1"/ "seleksjonsagar 1") (se 2.8 og 2.9.1). Når disse cellene huser pGBKT7- og pGADT7-konstrukter som uttrykker proteiner som viser interaksjon, vil reportergenet *his3* uttrykkes og cellene vil vokse på medier som ikke inneholder tryptofan, leucin og histidin (f.eks. "seleksjonsmedium 2"/ "seleksjonsagar 2") (se 2.8 og 2.9.2).

### 2.9.1 Protokoll for tillagning av seleksjonsmedium 1/seleksjonsagar 1:

"Minimal SD Base" (Clontech)	10,68 g
"-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement" (Clontech)	0,24 g
Destillert vann til	400 ml

Blandingen autoklaveres.

Blandingen tilsettes sterilfiltrert adenin til en sluttkonsentrasjon på 0,02 mg/ml og sterilfiltrert histidin til en sluttkonsentrasjon på 0,02 mg/ml.

Ved tillagning av seleksjonsagar 1 tilsettes 8,0 g Bacto-agar før autoklaveringen.

### 2.9.2 Protokoll for tillagning av seleksjonsmedium 2/seleksjonsagar 2:

”Minimal SD Base” (Clontech)	10,68 g
”-Ade/-His/-Leu/-Trp DO Supplement” (Clontech)	0,24 g
Destillert vann til	400 ml

Blandingen autoklaveres.

Blandingen tilsettes sterilfiltrert adenin til en sluttkonsentrasjon på 0,02 mg/ml.

Ved tillagning av seleksjonsagar 2 tilsettes 8,0 g Bacto-agar før autoklaveringen.

### 2.10 Dråpetest for monitorering av protein-protein interaksjoner i AH 109 gjær 2-hybrid systemet.

En interaksjon mellom proteiner i BD-og AD-konstrukter i AH 109 gjær 2-hybrid systemet vil aktivere transkripsjonen av reportergen *his3* (se 1.5) og gi vekst på seleksjonsagar 2 (se 2.9). Celler som har fått transformert inn plasmidkombinasjoner som ikke gir protein-protein interaksjoner vil vokse på seleksjonsagar 1, men ikke på seleksjonsagar 2 (se 2.9). I en dråpetest tas det utgangspunkt i en celledensitasjon med en bestemt optisk tetthet (O.D.) som er målt i et spektrofotometer. Denne celledensitasjonen fortynnes så henholdsvis 1:10, 1:100 og 1:1000. En dråpe (10 µl) av originaldensitasjonen og de 3 fortynningene dryppes så på agarskåler med ulikt innhold slik at veksten på de ulike skålene kan sammenliknes. I denne oppgaven ble veksten på seleksjonsagar 1 og seleksjonsagar 2 sammenliknet. Celler som er transformert med pGBKT7 uten innskudd og pGADT7 uten innskudd skal gi vekst på seleksjonsagar 1, men ikke på seleksjonsagar 2. Dette kalles en negativ kontroll. Kombinasjonen pGBKT7 uten innskudd og pGADT7 med innskudd skal også gi vekst på seleksjonsagar 1, men ikke på seleksjonsagar 2. Den samme gjelder for kombinasjonen pGBKT7 med innskudd og pGADT7 uten innskudd. Visse BD-og AD-konstrukter vil imidlertid aktivere reportergen uten at det har skjedd noen protein-protein interaksjon, såkalt autoaktivering. Ved autoaktivering vil de to ovennevnte plasmidkombinasjoner gi vekst på seleksjonsagar 2. Konstrukter som viser autoaktivering vil i utgangspunktet ikke kunne brukes for å påvise protein-

protein interaksjoner og det er derfor viktig at dråpetesten settes opp med kontroll for autoaktivering. Det finnes imidlertid en mulighet til å ”nulle ut” en bakgrunnsaktivering av reportergen *his3*, dette kan gjøres ved å tilsette 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) til seleksjonsagar 2. Denne forbindelsen er en kompetitiv inhibitor av produktet til *his3* genet (enzymet imidazolglyserolfosfat dehydratase). Konsentrasjonen av 3-AT i agaren kan titreres slik at bakgrunnsaktiveringen ”slukkes ut” mens protein-protein interaksjonen fortsatt kan avleses som vekst.

### 2.10.1 Protokoll for dråpetest:

1. En koloni overføres fra seleksjonsagar 1 til 2 ml seleksjonsmedium 1 og inkuberes ved 30°C under rysting over natt.
2. 1,5 ml medium fra pkt.1 sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 3 min..
3. Supernatanten suger av.
4. Det tilsettes 1000 µl sterilfiltrert 0,8% NaCl-løsning og cellepelletten løses opp.
5. Det sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 3 min..
6. Supernatanten suges av.
7. Det tilsettes 1000 µl sterilfiltrert 0,8% NaCl-løsning og cellepelletten løses opp.
8. Det sentrifugeres ved 16400 r.p.m. i 3 min..
9. Supernatanten suges av.
10. Cellepelletten løses i 500 µl sterilfiltrert 0,8% NaCl-løsning.
11. 100 µl av løsningen fra pkt.10 tilsettes 900 µl sterilfiltrert 0,8% NaCl-løsning.
12. O.D. måles i spektrofotometeret ved 600 nm og med sterilfiltrert 0,8% NaCl-løsning som referanseprøve.
13. Løsningen fra pkt.10 fortynnes med sterilfiltrert 0,8% NaCl-løsning til O.D.= 1,0.
14. Det lages 1:10, 1:100 og 1:1000 fortynninger av løsningen fra pkt.13 i sterilfiltrert 0,8% NaCl-løsning.
15. Det dryppes 10 µl av løsningen fra pkt.13 og 10 µl av hver av fortynningene fra pkt.14 på seleksjonsagar 1 og på seleksjonsagar 2. Avtagende konsentrasjon avsettes mot høyre på agarskålene.
16. Agarskålene tørkes under lokk ved romtemperatur, inkuberes deretter ved 30°C i 3 døgn og kontrolleres for vekst.

## 2.11 pGEM-T Easy vektor systemet brukt ved subkloning av *dnaA(1-373)*.

(Informasjon hentet fra "Technical Manual. pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems." (Promega 2007) ).

pGEM-T Easy er kuttet med restriksjonsenzymet EcoRV og hver 3'-ende er forsynt med en T. Kuttasetet er inne i genet *lacZ*. Det er dermed mulig å monitorere en fenotypisk forskjell mellom celler som inneholder plasmider med et DNA-fragment ligert inn og celler som inneholder plasmider uten innskudd. Bare de sistnevnte vil ha et funksjonelt *lacZ*-gen, og transkripsjonen av dette kan induseres av IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranosid). Genproduktet  $\beta$ -galaktosidase katalyserer spaltingen av en forbindelse, X-gal, og spaltingsproduktet vil reagere videre til en sterkt blåfarget, uløselig forbindelse (se 1.5). Når cellene dyrkes på agar som inneholder IPTG og X-gal, vil kolonier med celler med plasmider som inneholder et innskudd være hvite mens kolonier med celler med plasmider uten innskudd vil være blå. pGEM-T Easy inneholder også et gen for ampicillinresistens slik at ampicillin i vekstmediet vil selekttere celler transformert med plasmidet, for vekst. Pfu Ultra II fusion HS DNA polymerase (se 2.1) danner PCR-fragmenter med butte ender d.v.s uten enkelttrådede haler. For å kunne klones effektivt inn i pGEM-T Easy må disse fragmentene forsynes med en A-hale.

Følgende prosedyre ble fulgt ved "A-tailing" av PCR-produktet:

- |                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| 1. PCR-fragment (55 ng/ $\mu$ l)    | 5 $\mu$ l |
| 2. 10x Thermo Pol Reaction Buffer   | 1 $\mu$ l |
| 3. 2 mM dATP                        | 1 $\mu$ l |
| 4. Taq DNA polymerase 5000 units/ml | 1 $\mu$ l |
| 5. Nukleasefritt vann               | 2 $\mu$ l |
- 1.-5. blandes og inkuberes ved 70°C i 30 min..

Følgende prosedyre ble fulgt ved ligering av "A-tailed" PCR-produkt inn i pGEM-T Easy:

- |                                 |             |
|---------------------------------|-------------|
| 1. 2x Rapid Ligation Buffer     | 5,0 $\mu$ l |
| 2. pGEM-T Easy (50 ng/ $\mu$ l) | 1,0 $\mu$ l |

- |                                             |        |
|---------------------------------------------|--------|
| 3. Reaksjonsblanding "A-tailed" PCR-produkt | 2,1 µl |
| 4. T4 DNA Ligase (3 units/µl)               | 1,0 µl |
| 5. Nukleasefritt vann                       | 0,9 µl |

1.-5. blandes og inkuberes ved romtemperatur i 30 min. deretter ved 4°C over natt.

Plasmid ble transformert inn i "JM109 High Efficiency Competent Cells" (Promega).

Følgende prosedyre ble fulgt:

1. Røret med ligeringsblandingen ble sentrifugert ved 16400 r.p.m. i 1 min..  
2 µl ble overført til et eppendorfrør.
2. Cellesuspensjonen av JM109 ble tint på is i ca. 5 min.. og blandet ved forsiktig knipsing på røret.
3. 50 µl av cellesuspensjonen ble overført til røret fra pkt.1. og det ble blandet ved forsiktig knipsing på røret.
4. Røret ble plassert på is i 20 min..
5. Røret ble plassert ved nøyaktig 42°C i 50 sek..
6. Røret ble umiddelbart plassert på is i 2 min..
7. Røret ble tilsatt 950 µl LB-medium (romtemperert).
8. Cellene ble inkubert i 1,5 time ved 37°C under rysting (900 r.p.m.).

## 2.12 Sammenligning av DNA-sekvenser

DNA-sekvensene i plasmidinnskudd ble bestemt av GATC Biotech, Konstanz, Sveits ved sekvensering. Disse sekvensene ble sammenliknet med sekvensen til *dnaA* ved bruk av BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) på nettsiden til NCBI (National Center for Biotechnology Information).

([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROG\\_DEF=blastn&BLAST\\_PROG\\_DEF=megaBlast&SHOW\\_DEFAULTS=on&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=align2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq))

### 3. Resultater

#### 3.1 Konstruksjon av primere for PCR amplifisering av domene I av *dnaA* genet.

Primer DnaA(1-86)fw.(”forover”) ble gitt følgende sekvens, skrevet fra 5`- til 3`-ende: G GAA TTC **CAT ATG** TCA CTT TCG CTT TGG CAG CAG TG

Den **markerte** sekvensen CATATG er kuttasetet for restriksjonsenzymet NdeI og sekvensen til venstre for denne skal gi DNA-tråden en viss lengde slik at den kan fungere som substrat for dette enzymet. Den understrekte sekvensen er startsekvensen for *dnaA* genet. Det uvanlige startkodon GTG på genet er endret til ATG for å gjøre translasjonen mer effektiv.

Primer DnaA(1-86)rev.(”revers”) ble gitt følgende sekvens, skrevet fra 5`- til 3`-ende: GGA ATT **GGA TCC** TTT CGT TCG CAC CGG TTT G

Den **markerte** sekvensen GGA TCC er kuttasetet for restriksjonsenzymet BamHI og sekvensen til venstre for denne skal gi DNA-tråden en viss lengde slik at den kan fungere som substrat for dette enzymet. Den understrekte sekvensen er sekvensen til den komplementære DNA-tråden i *dnaA* genet fra nukleotid 258 til nukleotid 240 lest fra 5`- til 3`-ende i den komplementære tråden. Når sekvensen TTT virker som templat vil følgende sekvens syntetiseres i den nye tråden: TAA. Denne nye sekvensen er lest fra 5`- til 3`-ende i den nye tråden og vil her danne et stoppkodon. (Det funksjonelle stoppkodon i mRNA er UAA og det er den komplementære tråden som virker som templat ved transkripsjonen.)

Bruk av disse to primerne gir et PCR-produkt som inneholder nukleotidsekvensen 1-258 fra *dnaA* genet. Denne sekvensen koder for aminosyre 1-86 i DnaA (domene I). Etter nukleotid 258 følger et stoppkodon slik at transkripsjonen termineres når nukleotidene for domene I er transkribert. Sekvensen for domene I er flankert av kuttsetter for henholdsvis NdeI og BamHI.

Primer DnaA(1-86)fw. og primer DnaA(1-86)rev. ble syntetisert av Eurogentec S.A, Liege, Belgia.

### 3.2 PCR av domene I av *dnaA* genet

PCR ble utført i henhold til PCR-protokoll 1 (2.1.1). Det ble utført gelelektroforese på PCR-produktet i henhold til protokoll (2.2.1). PCR-produktet ga skarpe bånd i omlag samme avstand fra brønnene som størrelsesmarkøren for 300 nukleotider. Dette indikerer at PCR-produktet har den ønskede størrelse. Gelbitene med båndene ble skåret ut og DNA ble renset fra gelen i henhold til protokoll (2.2.2 ).

### 3.3 Kloning av *dnaA*(1-86) inn i vektor pGBKT7

PCR-produktet ble kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og BamHI i henhold til protokoll (2.3.1 ). Det ble utført preparativ gelelektroforese i henhold til protokoll (2.2.1) og det kuttete PCR-produktet ble renset fra gel i henhold til protokoll (2.2.2). Det kuttete PCR-produktet vil nå bestå av en kohesiv ende dannet av NdeI, en sekvens som koder for DnaAs aminosyrer 1-86, et stoppkodon og en kohesiv ende dannet av BamHI. Plasmidet pGBKT7 var tidligere kuttet med NdeI og BamHI og en løsning med dette kuttete plasmidet ble stilt til rådighet for denne oppgaven (Line Johnsen). Det kuttete PCR-produktet og det kuttete pGBKT7 vil ha komplementære kohesive ender og de kan derfor bindes til hverandre på en slik måte at PCR-produktet danner et innskudd i plasmidet. Dette innskuddet vil være plassert mellom plasmidets kuttsetter for henholdsvis NdeI og BamHI. Det nye plasmidet kan så ”lukkes” av T4 DNA Ligase (se 2.3). Det kuttete PCR-produktet og det kuttete pGBKT7 ble ført sammen i en ligeringsmiks i henhold til protokoll (2.3.3 ).

Ligeringsmiksen ble transformert inn i XL 10-Gold ultrakompetente celler i henhold til protokoll (2.4 ). Cellene ble deretter dyrket på LB-agar tilsatt kloramfenikol i konsentrasjon 30 ng/ml og kanamycin i konsentrasjon 50 ng/ml. XL 10-Golds genom inneholder et gen for kloramfenikolresistens ( Stratagene; produktinformasjon ) og pGBKT7 inneholder et gen for kanamycinresistens (se 2.7). Agaren som ble benyttet vil derfor selektene XL 10-Gold celler som er transformert med pGBKT7 eller pGBKT7/*dnaA*(1-86), for vekst. Etter inkubasjon ved 37°C over natt ble 6 kolonier



plukket fra agarskålene og suspendert i LB-medium, tilsatt kloramfenikol (30 ng/ml) og kanamycin (50 ng/ml), og inkubert ved 37°C over natt. Alle cellene i en koloni på agarskåla er etterkommere av ei enkelt celle og cellene som dyrkes fra en koloni utgjør derfor en klon; en samling av identiske kopier. Det ble undersøkt om noen av klonene inneholdt plasmid med innskuddt *dnaA*(1-86). Plasmidene fra de 6 ulike klonene ble rensset i henhold til protokoll (2.5 ) og kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og BamHI i henhold til protokoll (2.3.1 ). De ble utført gelelektroforese på de kuttete plasmidene fra de 6 klonene i henhold til protokoll (2.2 ) (se fig.10). (Markørene på figurene av gelelektroforese viser plassering av aktuelle fragment fra standarden, bp (basepar)=antall nukleotidpar i DNA-fragmentet.)

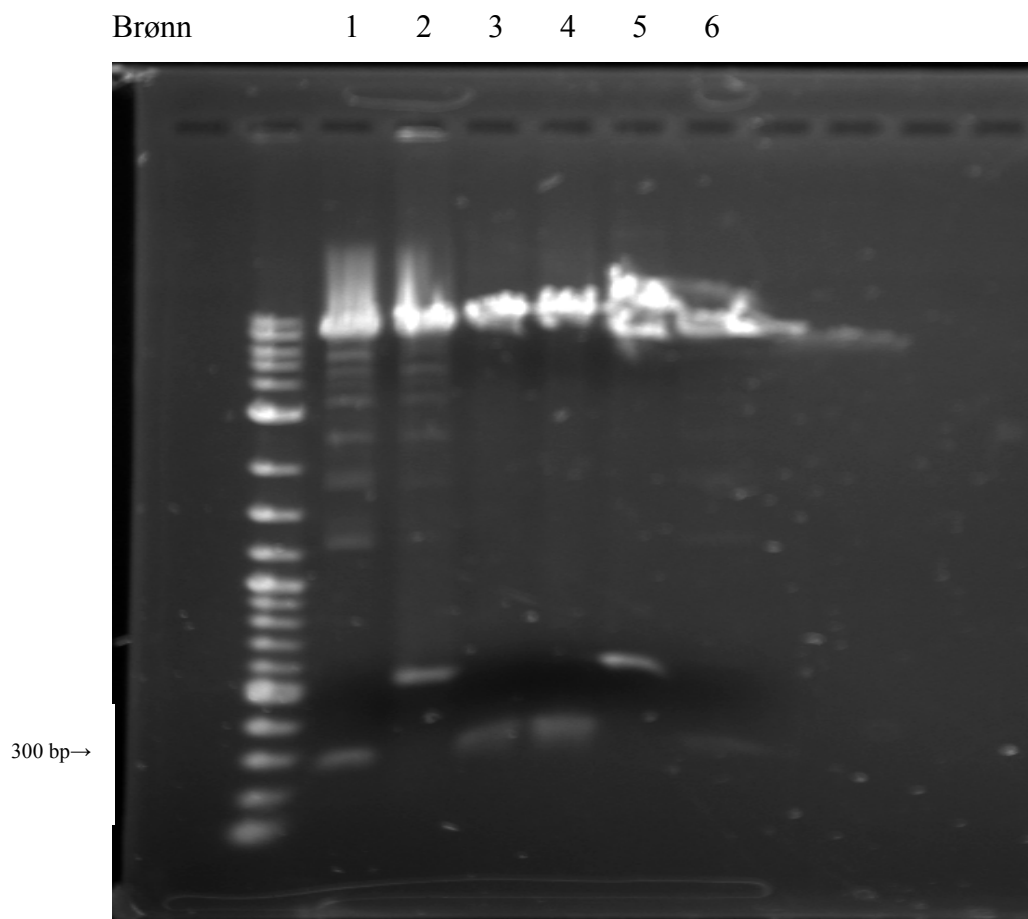


Fig.10

Gelelektroforese for undersøkelse av ulike kloner for innskudd av *dnaA*(1-86) i pGBKT7.

Plasmider fra en klon ble applisert i en brønn og figuren indikerer at klonene representert i brønn nr.1, 3 og 4 regnet fra standardbrønnen inneholder et innskudd av ønsket størrelse i sine plasmider. Klonen i brønn nr.1 ble gitt betegnelsen "HB01", klonen i brønn nr.3 ble gitt betegnelsen "HB02" og klonen i brønn nr. 4 ble gitt betegnelsen "HB03".

Isolert plasmid fra disse klonene ble sendt til sekvensering hos GATC Biotech, Konstanz, Sveits. Plasmid fra klonene HB01 og HB03 inneholdt riktig DNA-sekvens for *dnaA*(1-86) (se 2.12) og cellene i disse klonene inneholder altså plasmidet pGBKT7/*dnaA* (1-86).

### 3.4 Kloning av *dnaA*(1-86) inn i vektor pGADT7.

Celler fra bakteriestammen HB01 ble tatt fra -80°C og inkubert i 50 ml LB-medium, tilsatt kloramfenikol (30 ng/ml) og kanamycin (50 ng/ml), ved 37°C med risting 1000 r.p.m. over natt. Plasmidet pGBKT7/*dnaA*(1-86) ble rensset i henhold til protokoll (2.6) og kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og BamHI i henhold til protokoll (2.3.1). Etter preparativ elektroforese i henhold til protokoll (2.2.1) ble DNA-fragmentene med størrelse ca. 300 nukleotider rensset fra gel i henhold til protokoll (2.2.2). Plasmidet pGADT7 var tidligere kuttet med NdeI og BamHI og en løsning med dette kuttete plasmidet ble stilt til rådighet for denne oppgaven (Line Johnsen). DNA-fragmentet som kunne antas å være *dnaA*(1-86) ble ligert inn i kuttet pGADT7 i henhold til protokoll (2.3.3). Ligeringsmiksen ble transformert inn i XL 10-Gold ultrakompetente celler i henhold til protokoll (2.4). Cellene ble deretter dyrket på LB-agar tilsatt kloramfenikol i konsentrasjon 30 ng/ml og ampicillin i konsentrasjon 100 ng/ml. XL 10-Golds genom inneholder et gen for kloramfenikolresistens (Stratagene; produktinformasjon) og pGADT7 inneholder et gen for ampicillinresistens (se 2.7). Agaren som ble benyttet vil derfor selektere XL 10-Gold celler som er transformert med pGADT7 eller pGADT7/*dnaA*(1-86), for vekst. Etter inkubasjon ved 37°C over natt ble 8 kolonier plukket fra agarskålene, suspendert i LB-medium, tilsatt kloramfenikol (30 ng/ml) og ampicillin (100 ng/ml), og inkubert ved 37°C over natt. Plasmidene fra de 8 ulike klonene ble rensset i henhold

til protokoll (2.5 ) og kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og BamHI i henhold til protokoll (2.3.1). Det ble utført gelelektroforese på de kuttete plasmidene fra de 8 klonene i henhold til protokoll (2.2.1) (se fig.11).

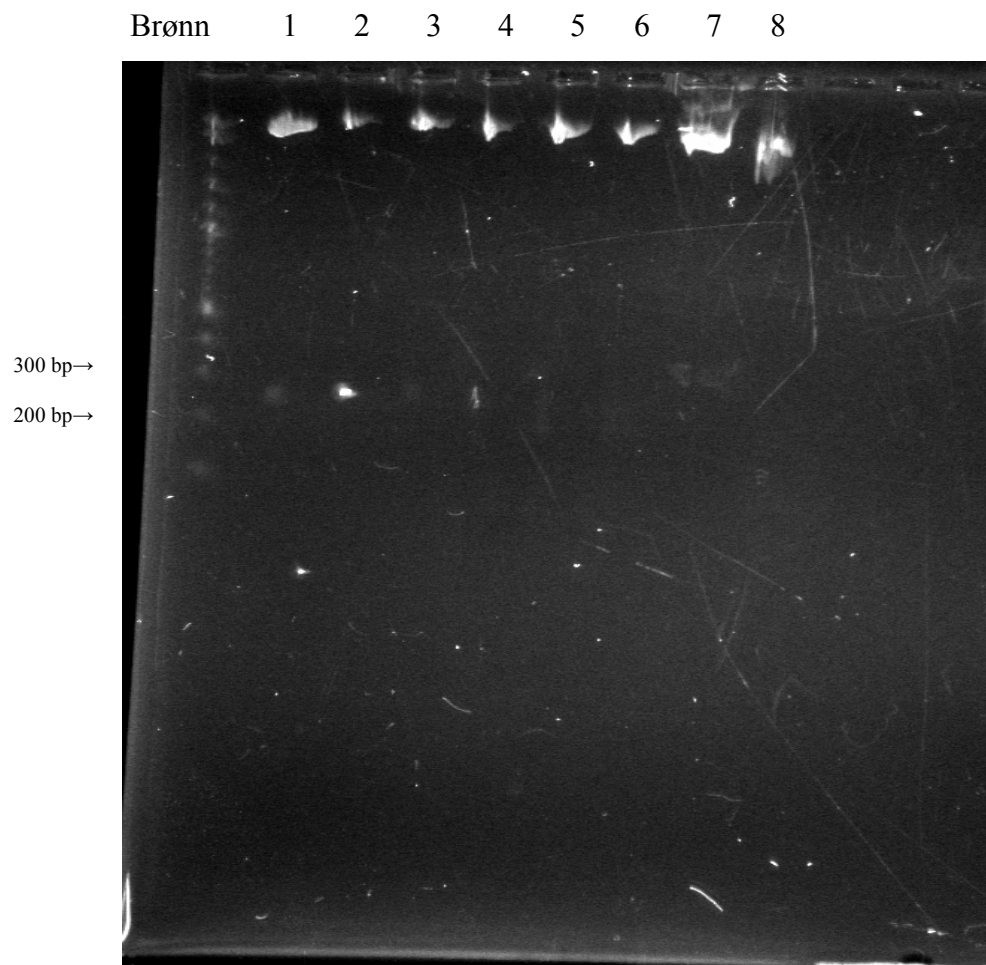


Fig.11

Gelelektroforese for undersøkelse av ulike kloner for innskudd av *dnaA*(1-86) i pGADT7.

Plasmider fra en klon er applisert i en brønn og figuren indikerer at klonen representert i brønn nr.1 regnet fra standardbrønnen inneholder innskudd av ønsket størrelse i sine plasmider. Klonen i brønn nr.1 ble gitt betegnelsen "HB04". Isolert plasmid fra denne klonen ble sendt til sekvensering hos GATC Biotech, Konstanz, Sveits. Plasmid fra klonen HB04 inneholdt riktig DNA-sekvens for *dnaA*( 1-86) (se 2.12) og cellene i denne klonen inneholder altså plasmidet pGADT7/ *dnaA* (1-86).

### 3.5 Transformering av plasmidene pGBKT7/*dnaA*(1-86) og pGADT7/*dnaA*(1-86) inn i gjærstammen AH 109 med undersøkelse av toksisitet og autoaktivering.

Gjærstammen AH 109 (se 2.8) ble tatt fra -80°C, spredt ut på YPD-agar og inkubert ved 30°C i 3 døgn. Plasmidene pGBKT7, pGADT7, pGBKT7/*dnaA*(1-86) og pGADT7/*dnaA*(1-86) ble rensset i henhold til protokoll (2.5). Følgende kombinasjoner ble transformert inn i AH 109 celler i henhold til protokoll (2.8.1):

1. pGBKT7 og pGADT7
3. pGBKT7 og pGADT7/*dnaA*(1-86)
4. pGBKT7/*dnaA*(1-86) og pGADT7
5. pGBKT7/*dnaA*(1-86) og pGADT7/*dnaA*(1-86)

Det ble satt opp en dråpetest (se 2.10) for de fire transformantene i henhold til protokoll (2.10.1) (se fig.12).

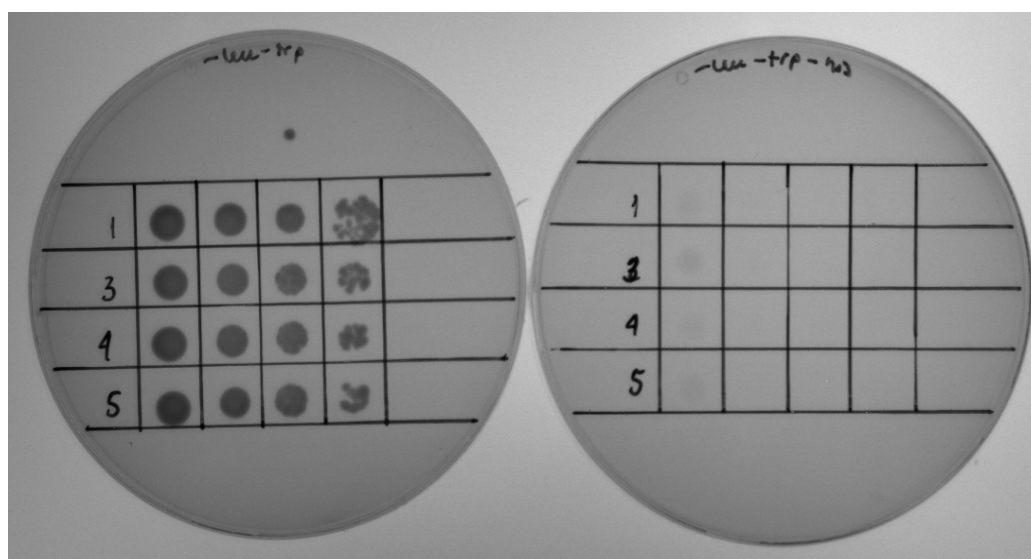


Fig.12

Dråpetest av AH 109 med pGBKT7/*dnaA*(1-86) , pGADT7/*dnaA*(1-86) og kontroller på seleksjonsagar 1 og 2.

Alle transformantene viste god vekst på seleksjonsagar 1 (til venstre på fig.12) (se 2.9). Ingen av plasmidene virket altså toksisk på AH 109-cellene. Alle transformantene som vokste på seleksjonsagar 1 inneholdt både pGBKT7 eller pGBKT7/*dnaA*(1-86) som gir vekst i fravær av tryptofan, og pGADT7 eller pGADT7/*dnaA*(1-86) som gir vekst i fravær av leucin (se 2.7).

Ingen av transformantene viste vekst på seleksjonsagar 2 (til høyre på fig.12) (se 2.9). Vekst på denne agaren krever aktivering av reportergen *his3* (se 2.8 og 2.9).

Transformant 1 inneholder intet *dnaA(1-86)* og fungerer som en negativ kontroll i dette gjær 2-hybrid systemet og resultatet er som forventet. Da verken transformant 3 eller transformant 4 vokste, viste ingen av konstruktene BD-DnaA(1-86) eller AD-DnaA(1-86) autoaktivering (se 1.5) i dette systemet. Resultatet for transformant 5 indikerer at interaksjonen mellom to DnaA(1-86)- moduler ikke lar seg påvise i dette systemet. Denne interaksjonen er tidligere verifisert (Weigel et al., 1999) og systemet gir et falskt negativt resultat for denne interaksjonen.

### 3.6 DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjonen kan ikke påvises gjennom aktivering av *his3*-genet.

Resultatet fra forsøket beskrevet i 3.5 ble bekreftet ved et nytt forsøk. Det ble satt opp dråpetest i henhold til protokoll (2.10.1) for 6 kolonier av transformanten med pGBKT7/*dna(1-86)* og pGADT7/*dna(1-86)* (se fig.13).

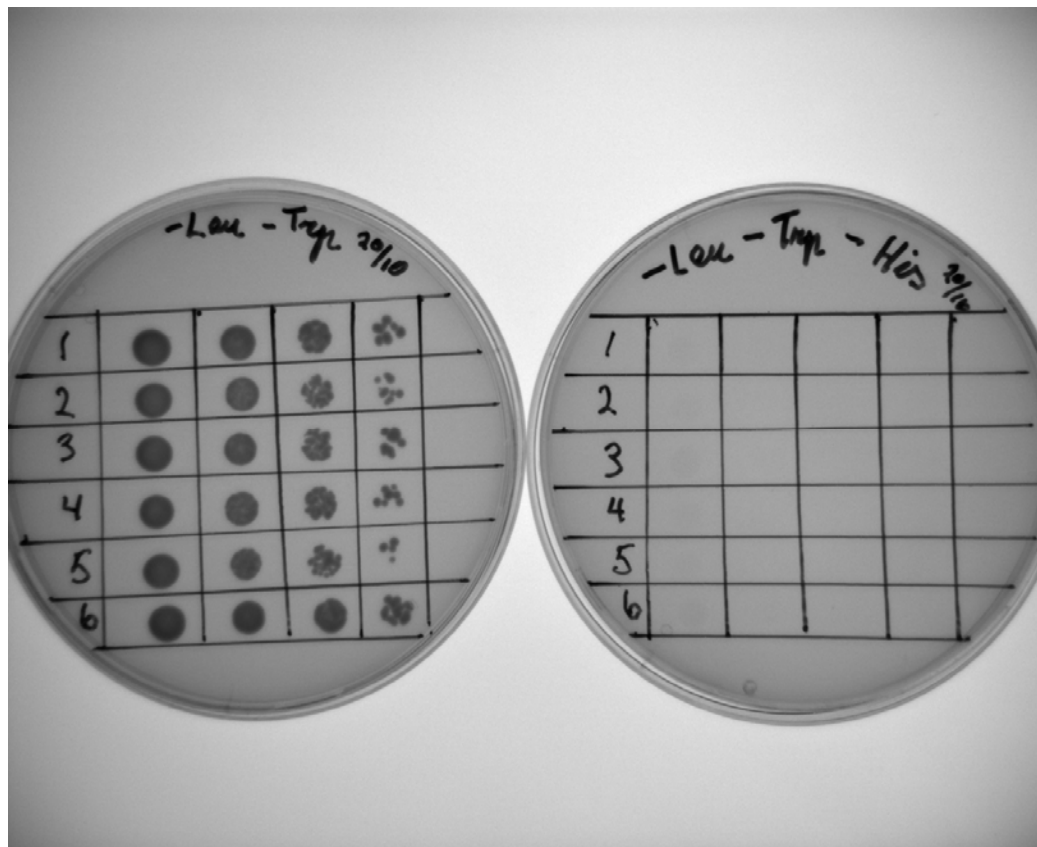


Fig.13

Dråpetest for 6 ulike kloner med pGBKT7/*dnaA(1-86)* og pGADT7/*dna(1-86)*

Alle de 6 klonene viser god vekst på seleksjonsagar 1 (til venstre på fig.13 ) mens ingen viser vekst på seleksjonsagar 2 (til høyre på fig. 13 ). DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjonen kan altså ikke påvises gjennom aktivering av *his3*-genet i dette systemet.

For å bekrefte at systemet under de gitte betingelser kan påvise sterke interaksjoner mellom proteiner ble det satt opp et forsøk med en positiv kontroll. Den kjente

interaksjonen som ble benyttet til dette formålet var den mellom Hda og "β-sliding clamp" (se 1.4). Genet *dnaN* koder for "β-sliding clamp" (Burgers et al., 1981). Plasmidene pGBKT7/*hda* og pGADT7/*dnaN* var tidligere konstruert og løsninger av disse ble stilt til rådighet for denne oppgaven (Line Johnsen). Konstruktene BD-Hda og AD-"β-sliding clamp" vil aktivere reportergenet *his3* i gjærsystemet (Line Johnsen; personlig meddelelse) p.g.a. den kjente sterke interaksjonen mellom Hda og "β-sliding clamp" (Suetsugu et al., 2005). Følgende kombinasjoner ble transformert inn i AH 109 celler i henhold til protokoll (2.8.1):

1. pGBKT7/*hda* og pGADT7/*dnaN*
2. pGBKT7 og pGADT7/*dnaA*(1-86)
3. pGBKT7/*dnaA*(1-86) og pGADT7
4. pGBKT7/*dnaA*(1-86) og pGADT7/*dnaA*(1-86)

Det ble satt opp en dråpetest for de fire transformantene i henhold til protokoll (2.10.1) (se fig.14).

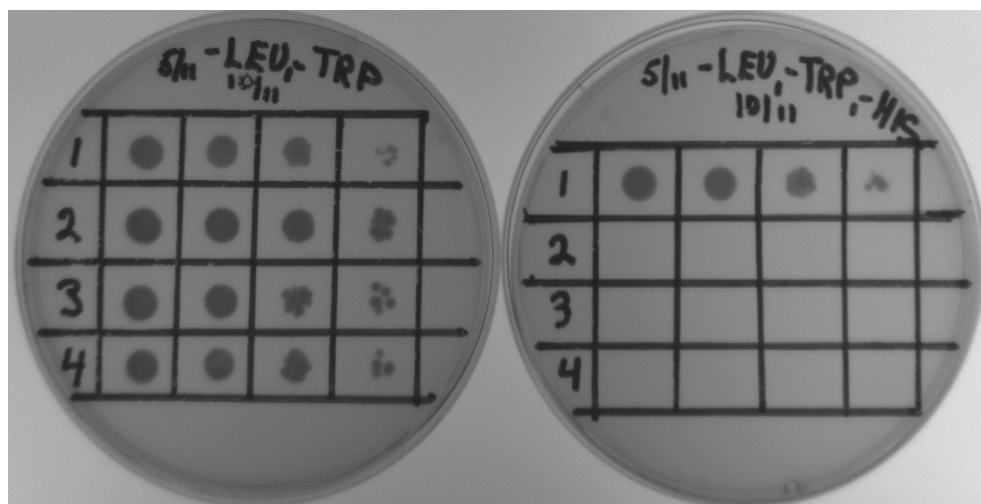


Fig.14

Dråpetest av positiv kontroll

Alle transformantene viser god vekst på seleksjonsagar 1 (til venstre på fig.14). Transformantene 2, 3 og 4 viser ingen vekst på seleksjonsagar 2 (til høyre på fig.14), dette er i overensstemmelse med resultatene fra de tidligere forsøkene. "pGBKT7/*hda* og pGADT7/*dnaN*"-transformanten viser god vekst på seleksjonsagar 2 og det bekrefter at en sterk protein-protein interaksjon vil aktivere reportergenet *his3* i dette systemet.

Resultatene i dette forsøket ble bekreftet i et nytt forsøk hvor samme merking ble benyttet (se fig.15).

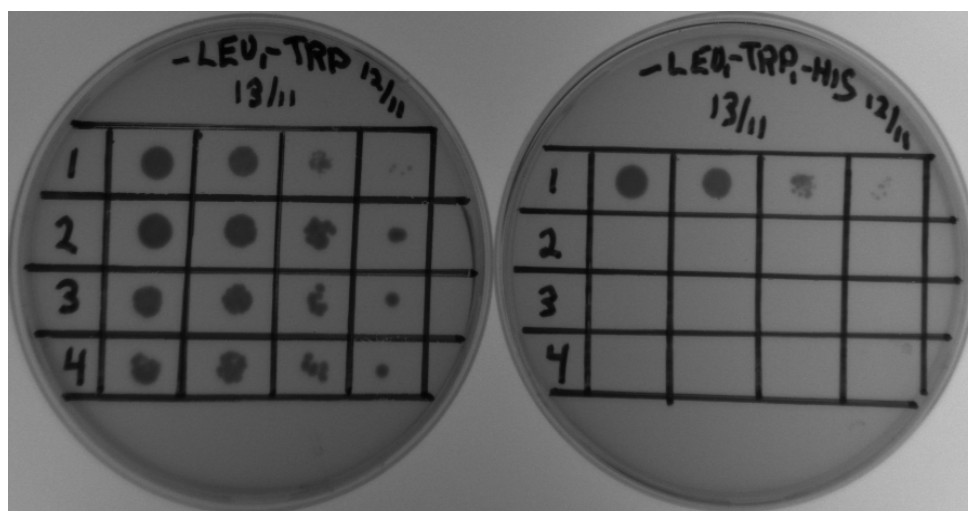


Fig.15

Repetert dråpetest av positiv kontroll

DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjon kan altså ikke påvises gjennom aktivering av *his3*-genet i dette systemet. Domene III av DnaA er imidlertid også en viktig deltager i interaksjonen mellom to DnaA-molekyler (Messer et al., 2001). Domene I-III i DnaA omfatter aminosyrene 1-373 (se 1.4) og det ville være interessant å undersøke om konstruktene BD-DnaA(1-373) og AD-DnaA(1-373) kan aktivere *his3*-genet i foreliggende system.

### 3.7 Konstruksjon av primere for PCR amplifisering av domene I-III av *dnaA* genet.

Primer DnaA(1-86)fw. (se 3.1) kan brukes da sekvensen som skal amplifiseres har samme startpunkt som *dnaA*(1-86).

Primer DnaA(1-373)rev. ble gitt følgende sekvens, skrevet fra 5' - til 3'-ende:

GGA ATT **GGA TCC** TTT CAG TTT TTC CTG CAA TGC CAG C

Den **markerte** sekvensen GGA TCC er kuttesetet for restriksjonsenzymet BamHI og sekvensen til venstre for denne skal gi DNA-tråden en viss lengde slik at den kan fungere som substrat for dette enzymet. Den understrekte sekvensen er sekvensen til



den komplementære DNA-tråden i *dnaA* genet fra nukleotid 1119 til nukleotid 1098 lest fra 5'- til 3'-ende i den komplementære tråden. Når sekvensen TTA virker som templat vil følgende sekvens syntetiseres i den nye tråden: TAA. Denne nye sekvensen er lest fra 5'- til 3'-ende i den nye tråden og vil her danne et stoppkodon. (Det funksjonelle stoppkodon i mRNA er UAA og det er den komplementære tråden som virker som templat ved transkripsjonen.) Bruk av disse to primere gir et PCR-produkt som inneholder nukleotidsekvensen 1-1119 fra *dnaA* genet. Denne sekvensen koder for aminosyre 1-373 i DnaA altså domene I-III. Etter nukleotid 1119 følger et stoppkodon slik at transkripsjonen termineres når nukleotidene for domene I-III er transkribert. Sekvensen for domene I-III er flankert av kutteseter for henholdsvis NdeI og BamHI. Primer DnaA(1-373)rev. ble syntetisert av Eurogentec S.A, Liege, Belgia.

### 3.8 PCR av domene I-III av *dnaA* genet

PCR ble utført i henhold til PCR-protokoll 2 (2.1.2). Det ble utført gelelektroforese på PCR-produktet i henhold til protokoll (2.2.1) (se fig.16).

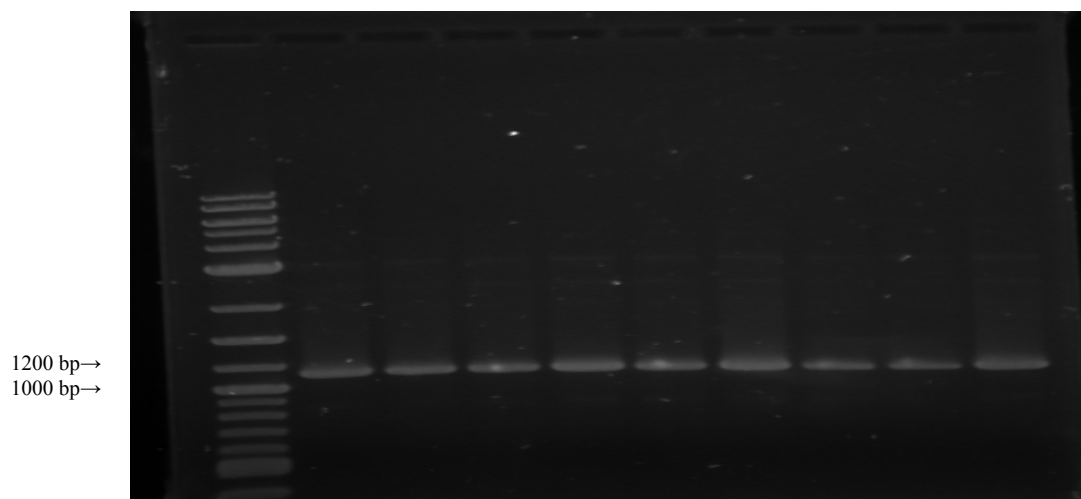


Fig.16

Gelelektroforese av PCR-produkt for *dnaA*(1-373)

Fig.16 viser at PCR-produktet ga skarpe bånd mellom størrelsesmarkørene for 1000 og 1200 nukleotider. Dette indikerer at PCR-produktet har den ønskede størrelse.

Gelbitene med båndene ble skåret ut og DNA ble renset fra gelen i henhold til protokoll (2.2.2).

### 3.9 Kloning av *dnaA*(1-373) inn i vektor pGBKT7

Fordi det viste seg vanskelig å klonе *dnaA*(1-373) direkte inn i pGBKT7, ble PCR-produktet fra 3.8 først klonet inn i vektoren pGEM Easy (se 2.11). 100 µl av cellesuspensjonen fra transformeringen av JM 109 med ligeringsmiksen ”pGEM Easy + PCR-produkt” (se 2.11) ble strøket ut på LB-agar med følgende tilsetninger:

- X-Gal (50 mg/ml) 80 µl/50 ml agar
- IPTG (1 M) 25 µl/50 ml agar
- Ampicillin (100 µg/ml) 50 µl/50 ml agar

Agarplatene ble inkubert ved 37°C over natt.

Celler med plasmid med innskudd vil gi opphav til hvite kolonier, celler med plasmid uten innskudd vil gi opphav til blå kolonier (se 2.11). 6 hvite og 1 blå koloni ble plukket og suspendert i hvert sitt rør med 1,5 ml LB-medium tilsatt 1,5 µl ampicillin (100 µg/ml) og inkubert ved 37°C under risting over natt. Plasmidene ble renset i henhold til protokoll (2.5). Det ble utført gelelektroforese i henhold til protokoll (2.2.1) (se fig.17). Plasmidene fra den blå kolonien (brønn 7) danner et svakt bånd ved ca. 3000 nukleotider (pGEM-T Easy inneholder 3015 nukleotider). Plasmidene fra de hvite koloniene (brønn 1-6) danner tydelige bånd ved ca. 4000 nukleotider. Dette indikerer at PCR-produktet er ligert inn i pGEM-T Easy. Plasmid fra klonen i brønn 1 ble renset i henhold til protokoll (2.5) og sendt GATC Biotech, Konstanz, Sveits for sekvensering. Det inneholdt sekvensen for det ønskede PCR-produktet (se 2.12) og cellene i denne klonen inneholder altså pGEM-T Easy/”PCR-produkt”.

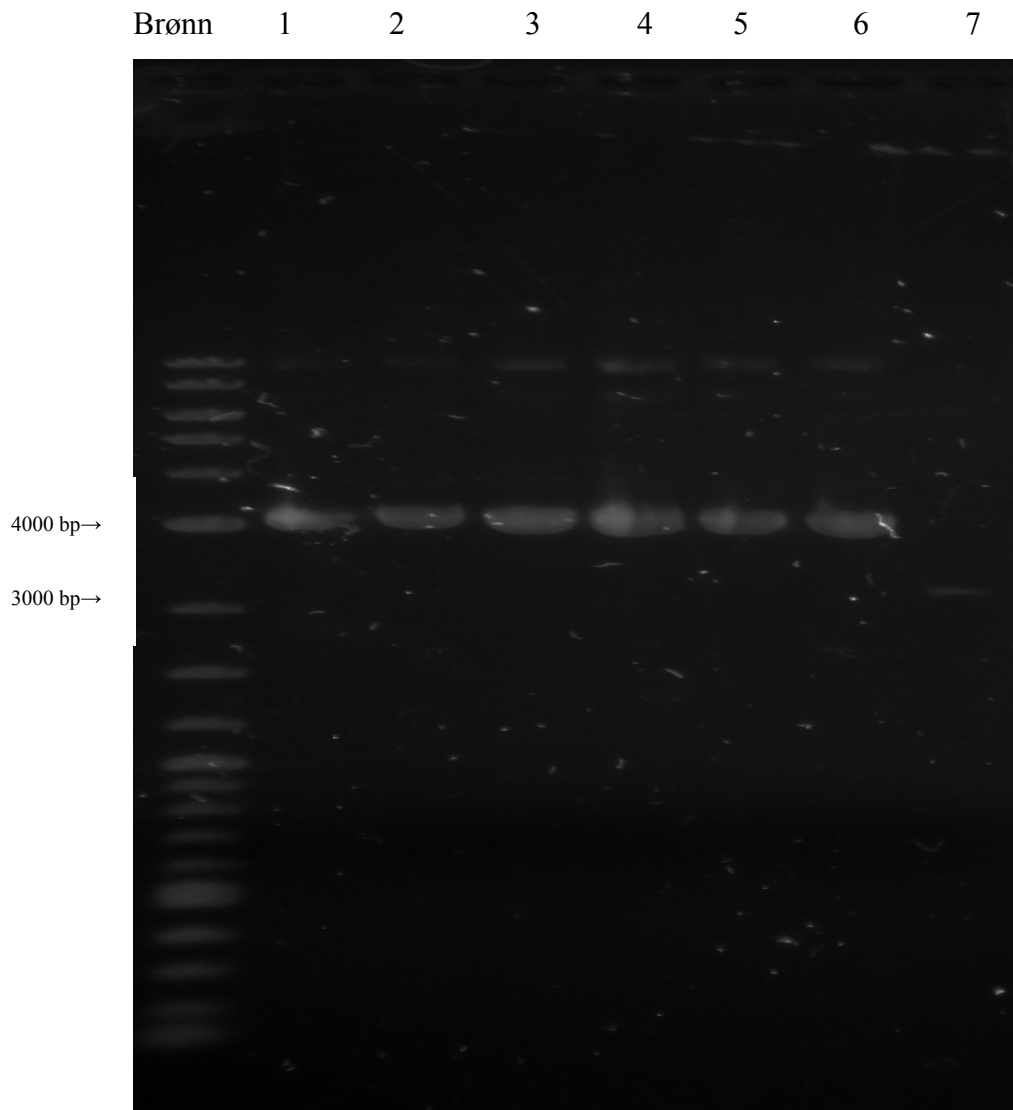


Fig.17

Gelelektroforese av plasmidet pGEM-T Easy med og uten innskudd.

pGEM Easy/"PCR-produkt" ble kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og BamHI i henhold til protokoll (2.3.1). Det ble utført gelelektroforese på reaksjonsblandingen i henhold til protokoll (2.2.1 ) (se fig.18).

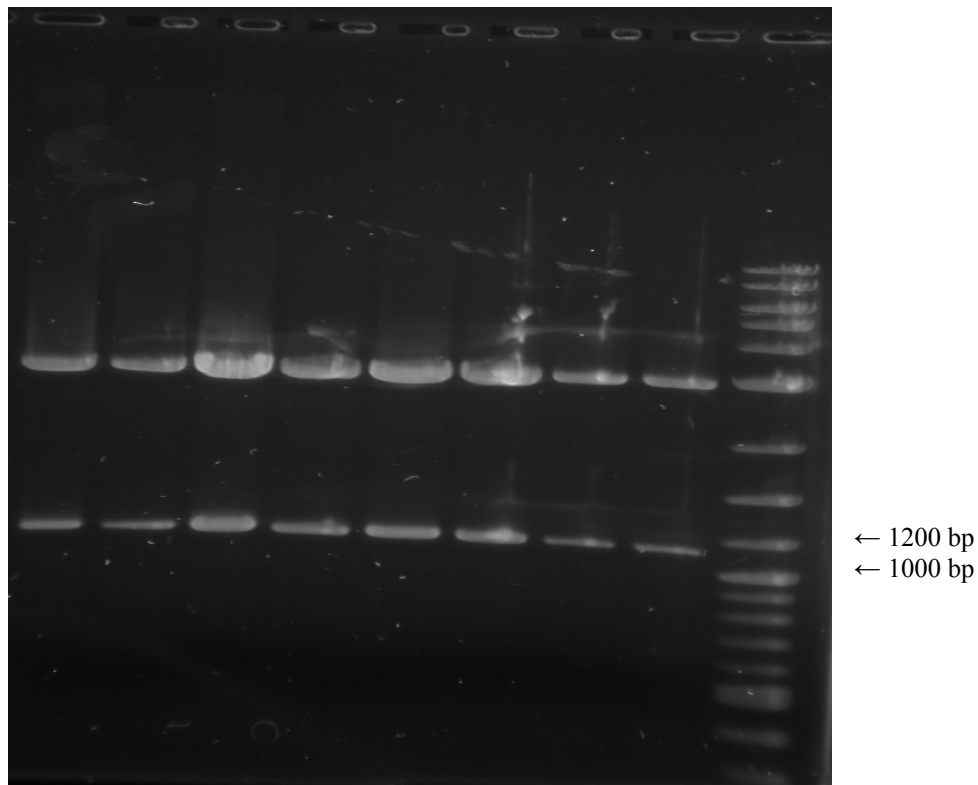


Fig.18

Gelelektroforese av kuttet pGEM Easy med innskudt "PCR-produkt".

(Størrelsesmarkørene er avbildet til høyre).

Gelbitene med båndene ved ca. 1100 nukleotider ble skåret ut og rensert i henhold til protokoll (2.2.2). Det kuttete PCR-produktet vil nå bestå av en kohesiv ende dannet av NdeI, en sekvens som koder for DnaAs aminosyrer 1-373, et stoppkodon og en kohesiv ende dannet av BamHI. Plasmidet pGBKT7 var tidligere kuttet med NdeI og BamHI og en løsning med dette kuttete plasmidet ble stilt til rådighet for denne oppgaven (Line Johnsen). Det kuttete PCR-produktet og det kuttete pGBKT7 vil ha komplementære kohesive ender og de kan derfor bindes til hverandre på en slik måte at PCR-produktet danner et innskudd i plasmidet. Dette innskuddet vil være plassert mellom plasmidets kutteteseter for henholdsvis NdeI og BamHI. Det nye plasmidet kan så "lukkes" av T4 DNA Ligase (se 2.3). Det kuttete PCR-produktet og det kuttete pGBKT7 ble ført sammen i en ligeringsmiks i henhold til protokoll (2.3.3).

Ligeringsmiksen ble transformert inn i XL 10-Gold ultrakompetente celler i henhold til protokoll (2.4). Cellene ble deretter dyrket på LB-agar tilsatt kloramfenikol i konsentrasjon 30 ng/ml og kanamycin i konsentrasjon 50 ng/ml. XL 10-Golds genom inneholder et gen for kloramfenikolresistens (Stratagene; produktinformasjon) og

pGBKT7 inneholder et gen for kanamycinresistens (se 2.7). Agaren som ble benyttet vil derfor selektere XL 10-Gold celler som er transformert med pGBKT7 eller pGBKT7/*dnaA*(1-373), for vekst. Etter inkubasjon ved 37°C over natt ble 4 kolonier plukket fra agarskålene og suspendert i LB-medium, tilsatt kloramfenikol (30 ng/ml) og kanamycin (50 ng/ml), og inkubert ved 37°C over natt. Plasmidene fra de 4 ulike klonene ble rensset i henhold til protokoll (2.5) og kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og BamHI i henhold til protokoll (2.3.1). Det ble utført gelelektroforese på de kuttete plasmidene fra de 4 klonene i henhold til protokoll (2.2.1 ) (se fig.19).

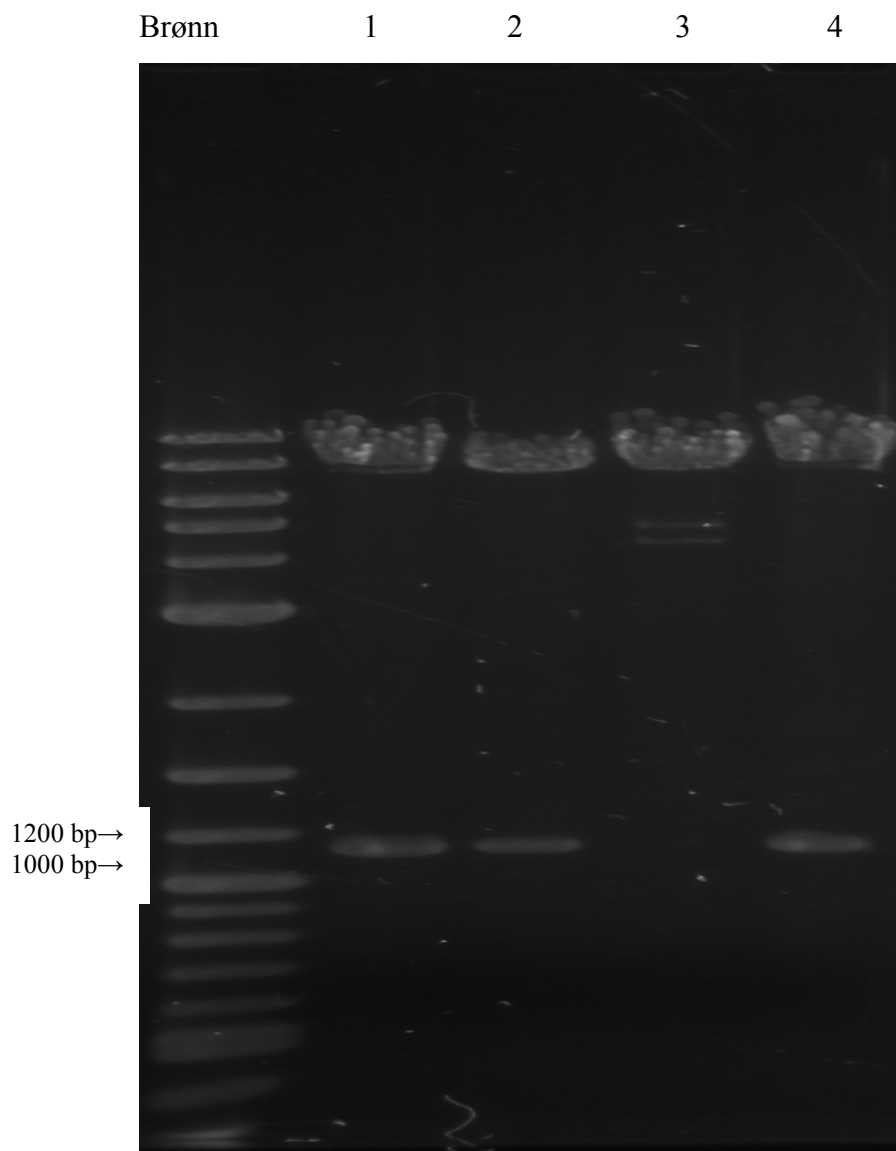


Fig.19

Gelelektroforese for undersøkelse av ulike kloner for innskudd av *dnaA*(1-373) i pGBKT7.

Plasmider fra en klon er applisert i en brønn og fig.19 indikerer at klonene representert i brønn nr.1, 2 og 4 regnet fra standardbrønnen inneholder det ønskede innskudd i sine plasmider. Klonen i brønn nr.1 ble gitt betegnelsen "HB09", klonen i brønn nr.2 ble gitt betegnelsen "HB10" og klonen i brønn nr.4 ble gitt betegnelsen "HB11". Isolert plasmid fra HB09 ble sendt til sekvensering hos GATC Biotech, Konstanz, Sveits. Plasmid fra denne klonen inneholdt riktig DNA-sekvens for *dnaA*( 1-373) (se 2.12) og cellene i denne klonen inneholder altså plasmidet pGBKT7/ *dnaA* (1-373).

### 3.10 Kloning av *dnaA*(1-373) inn i vektor pGADT7.

Celler fra bakteriestammen HB09 ble tatt fra -80°C og inkubert i 3 ml LB-medium, tilsatt kloramfenikol (30 ng/ml) og kanamycin (50 ng/ml), ved 37°C med rysting 1000 r.p.m. over natt. Plasmidet pGBKT7/*dnaA* (1-373) ble renset i henhold til protokoll (2.5) og kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og BamHI-HF i henhold til protokoll (2.3.2). Etter preparativ elektroforese i henhold til protokoll (2.2.1) ble DNA-fragmentene med størrelse ca. 1100 nukleotider (se fig.20) renset fra gel i henhold til protokoll(2.2.2 ).

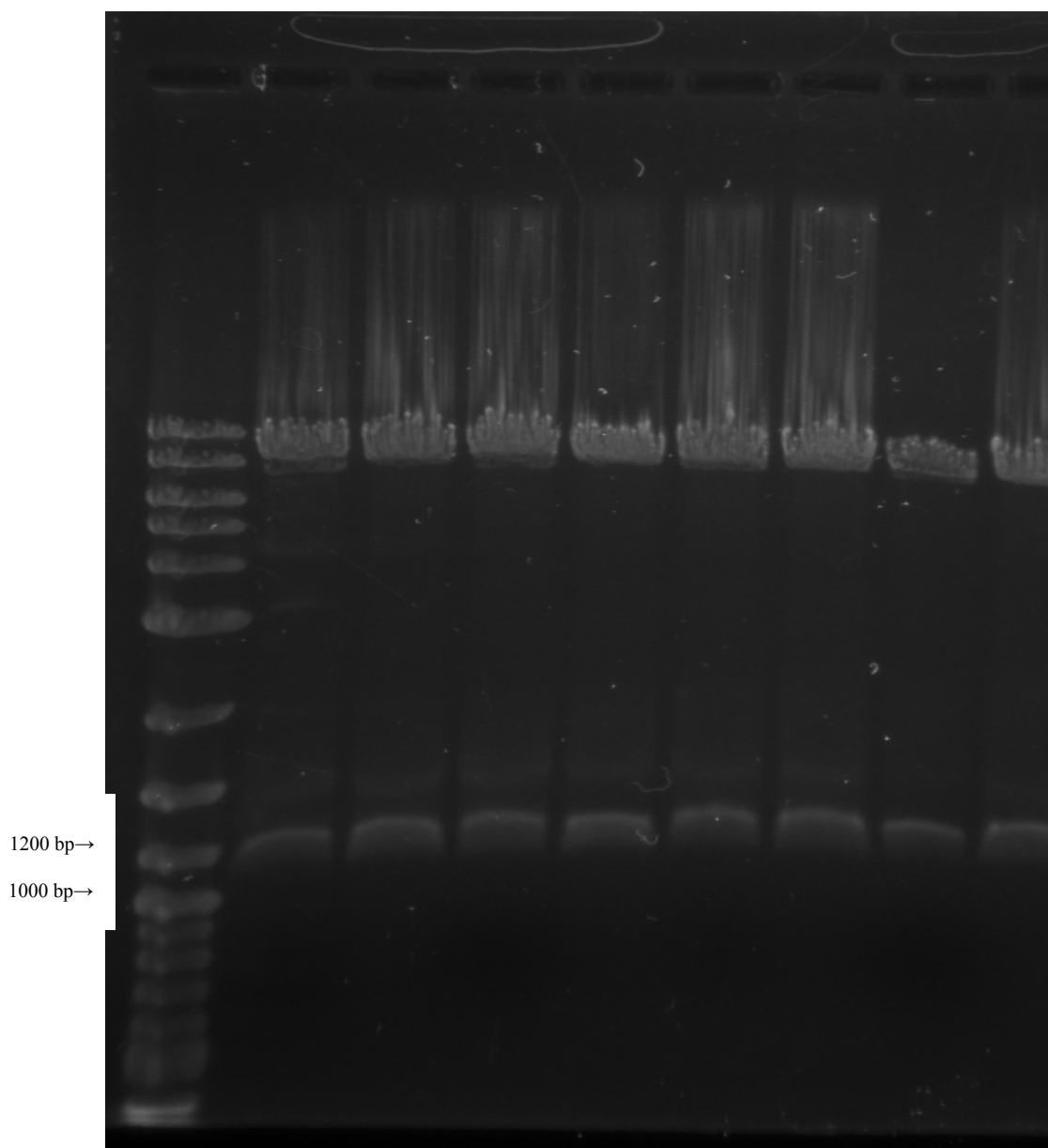


Fig.20  
Gelelektroforese av kuttet pGBK/*dnaA*(1-373)

Plasmidet pGADT7 ble kuttet med NdeI og BamHI-HF i henhold til protokoll (2.3.2). Etter preparativ gelelektroforese i henhold til protokoll (2.2.1) ble DNA-fragmentene med størrelse ca. 8000 nukleotider (se fig.21) renset fra gel i henhold til protokoll (2.2.2).

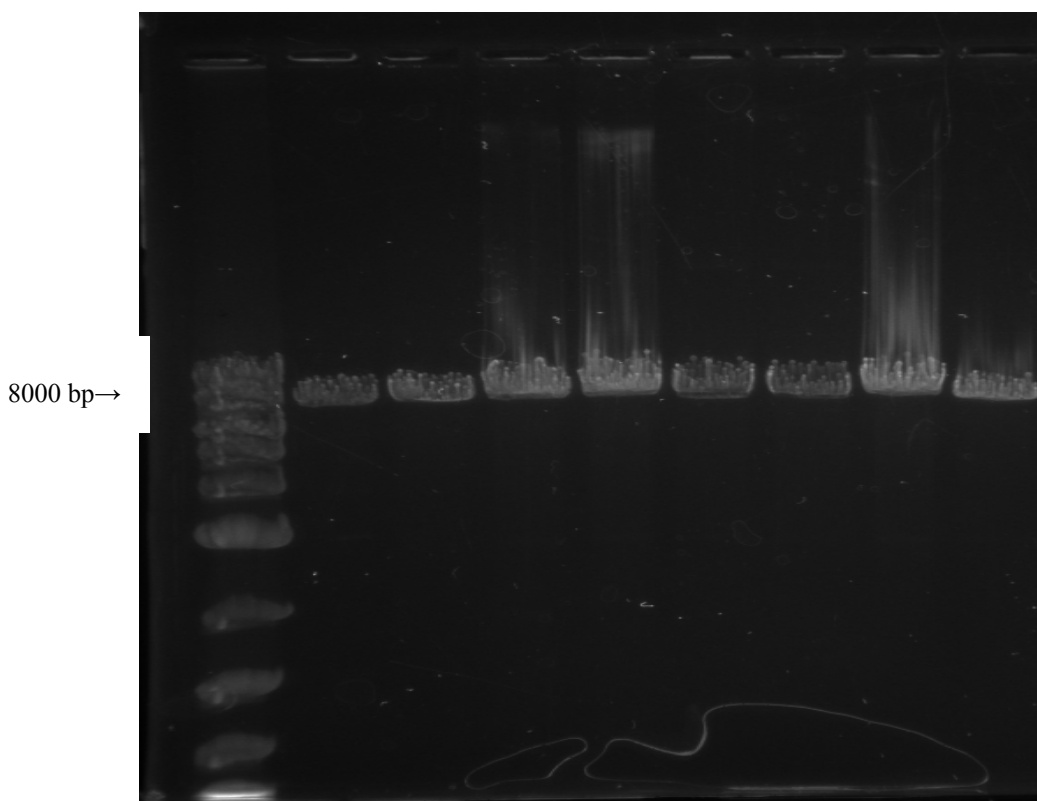


Fig.21

Gelelektroforese av kuttet pGADT7

DNA-fragmentet som kunne antas å være *dnaA*(1-373) ble ligert inn i kuttet pGADT7 i henhold til protokoll (2.3.3). Ligeringsmiksen ble transformert inn i XL 10-Gold ultrakompetente celler i henhold til protokoll (2.4). Cellene ble deretter dyrket på LB-agar tilsatt kloramfenikol i konsentrasjon 30 ng/ml og ampicillin i konsentrasjon 100 ng/ml. Denne agaren vil selekttere XL 10-Gold celler som er transformert med pGADT7 eller pGADT7/*dnaA*(1-86), for vekst. Etter inkubasjon ved 37°C over natt ble 6 kolonier plukket fra agarskålene og suspendert i LB-medium, tilsatt kloramfenikol (30 ng/ml) og ampicillin (100 ng/ml), og inkubert ved 37°C over natt. Plasmidene fra de 6 ulike klonene ble renset i henhold til protokoll (2.5), og kuttet med restriksjonsenzymene NdeI og BamHI-HF i henhold til protokoll



(2.3.2). Det ble utført gelelektroforese på de kuttete plasmidene fra de 6 klonene i henhold til protokoll (2.2.1) (se fig.22).

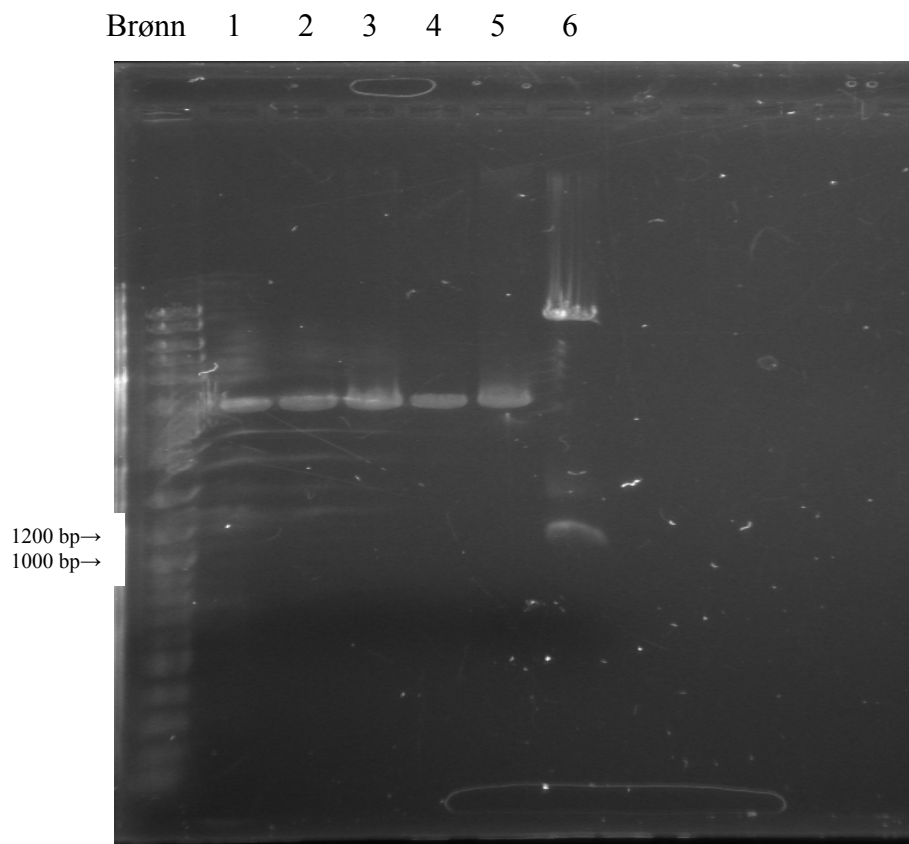


Fig.22

Gelelektroforese for undersøkelse av ulike kloner for innskudd av *dnaA(1-373)* i pGADT7.

Plasmider fra en klon er applisert i en brønn og fig. 22 indikerer at klonen representert i brønn nr.6 regnet fra standardbrønnen inneholder *dnaA(1-373)* i sitt plasmid. Klonen i brønn nr.6 ble gitt betegnelsen "HB12". Isolert plasmid fra HB12 ble sendt til sekvensering hos GATC Biotech, Konstanz, Sveits. Plasmid fra denne klonen inneholdt riktig DNA-sekvens for *dnaA (1-373)* (se 2.12) og cellene i denne klonen inneholder altså plasmidet pGADT7/*dnaA (1-373)*.

### 3.11 DnaA(1-373)-DnaA(1-373) interaksjonen kan påvises gjennom aktivisering av *his3* genet.

Følgende kombinasjoner ble transformert inn i AH 109 celler i henhold til protokoll (2.8.1):

1. pGBKT7-T og pGADT7-53
2. pGBKT7 og pGADT7
3. pGBKT7/dnaA(1-373) og pGADT7
4. pGBKT7 og pGADT7/dnaA(1-373)
5. pGBKT7/dnaA(1-373) og pGADT7/dnaA(1-373)

Det ble satt opp en dråpetest for de fem transformantene i henhold til protokoll (2.10.1) (se fig.23). Transformant 1 tjener som en positiv kontroll. Den benytter den kjente sterke interaksjonen mellom "SV 40 virus large T-antigen" og tumor suppressor p53 (Li og Fields, 1993). Transformant 2 tjener som negativ kontroll. Transformant 3 monitorerer en eventuell autoaktivering fra konstruktet BD-DnaA(1-373). Transformant 4 monitorerer en eventuell autoaktivering fra konstruktet AD-DnaA(1-373).

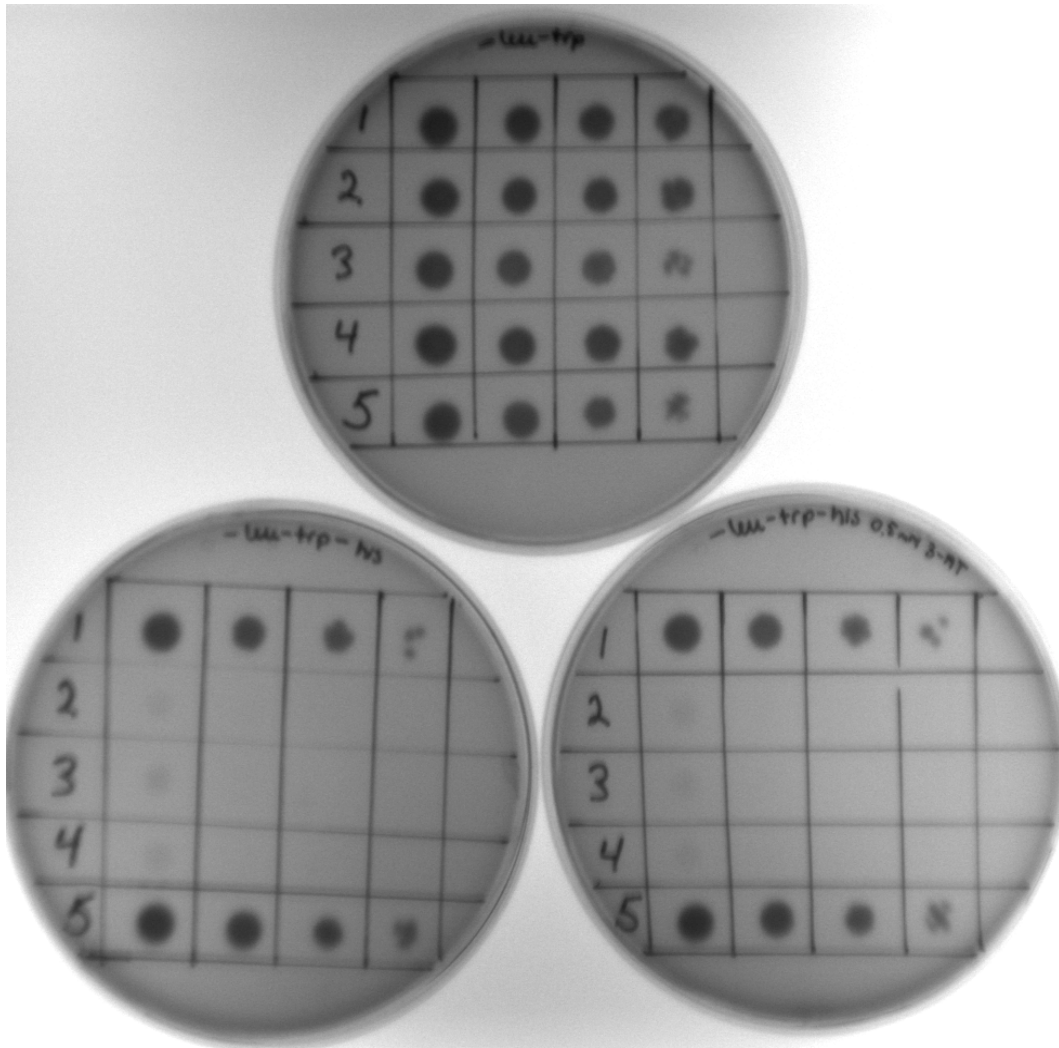


Fig.23

Dråpetest for påvisning av DnaA(1-373)-DnaA(1-373) interaksjon

Alle de fem transformantene viser god vekst på seleksjonsagar 1 (øverst på fig. 23) (se 2.9), ingen av plasmidene virket altså toksisk på AH 109-cellene. "pGBKT7-T og pGADT7-53" viste som ventet vekst på seleksjonsagar 2 (nederst til venstre på fig. 23) (se 2.9). "pGBKT7 og pGADT7" viste som ventet ikke vekst på seleksjonsagar 2. Verken "pGBKT7/*dnaA*(1-373) og pGADT7" eller "pGBKT7 og pGADT7/*dnaA*(1-373)" viste vekst på seleksjonsagar 2. Konstruktene BD-DnaA(1-373) og AD-DnaA(1-373) viser altså ikke autoaktivering i dette systemet (se 1.5). "pGBKT7/*dnaA*(1-373) og pGADT7/*dnaA*(1-373)" viste god vekst på seleksjonsagar 2. DnaA(1-373)-DnaA(1-373) interaksjonen kan altså påvises gjennom aktivering av *his3*-genet i dette systemet.

Dråpetesten utført på seleksjonsagar 2 tilsatt 0,5 mM 3-AT (nederst til høyre på fig. 23 ) viste samme resultat som den på seleksjonsagar 2. Denne agarskålen var tatt med i forsøket for å undersøke ”utslukking” av en eventuell autoaktivering (se 2.10 ). Resultatet fra forsøket ble senere bekreftet av forsøk utført av Line Johnsen (Line Johnsen; personlig meddelelse).

## 4. Diskusjon

### 4.1 DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjonen er ikke egnet til bruk i gjær 2-hybrid screening.

Interaksjon mellom to DnaA-moduler som består av domene I ( aminosyre 1-86 fra den aminoterminalen av proteinet) kan ikke påvises ved aktivisering av reporter-genet *his3* i det gjær 2-hybrid systemet som ble brukt i denne oppgaven (se 3.6). Gjær 2-hybrid system gir en in vivo test på interaksjon mellom to proteiner eller proteinmoduler (se 1.5), men det tester ikke den fysiologiske interaksjonen mellom vedkommende protein eller proteinmoduler. Denne testen foregår i den eukaryote organismen *Saccharomyces cerevisiae* mens DnaA(1-86) er en bakteriespesifikk proteinmodul isolert fra *Escherichia coli*. Den fysiologiske interaksjonen mellom domene I fra to DnaA-molekyler foregår i et miljø som er helt ulikt miljøet i gjær 2-hybrid systemet. Proteininteraksjoner er dynamiske prosesser og en forutsetning for interaksjon er nærhet i rom. Forhold som gjør at interaksjonspartnerne konsentreres på et lite område vil øke sannsynligheten for at de vil komme så nær hverandre at interaksjon kan skje.

To forhold i *Escherichia coli* bevirker en lokal konsentrasjon av DnaA-molekyler (og dermed DnaA(1-86)). Bindingssteder for DnaA på DNA er konsentrert til spesifikke relativt korte DNA-sekvenser, f.eks. *oriC* (Mott og Berger, 2007). Proteinene DnaA danner en tetramer som binder DnaA-molekyler slik at de bringes nær hverandre og forblir i den posisjonen over tid (Katayama, 2008). Den fysiologiske interaksjonen mellom to DnaA(1-86)-moduler kan derfor være sterkere enn den interaksjonen som testes i gjær 2-hybrid systemet, og den sistnevnte kan være for svak til å utløse uttrykk av reporter-genet *his3*.

Det er utviklet mange varianter av gjær 2-hybrid systemer (se 1.5). Flere ulike reporter-gen er tatt i bruk, f.eks. har AH 109 fire reporter-gen (se 2.8). Nye systemer hvor protein-protein interaksjonen gir rekonstruksjon av andre biologisk aktive enheter enn transkripsjonsfaktorer er også utviklet (Brückner et.al., 2009) (se 1.5).

Det er selvsagt teoretisk mulig at DnaA(1-86)-DnaA(1-86) interaksjonen kan påvises i slike alternative systemer, men resultatet i denne oppgaven gjør at sannsynligheten for et slikt utfall er redusert.

#### 4.2 DnaA(1-373)-DnaA(1-373) interaksjonen kan brukes i gjær 2-hybrid screening.

Interaksjon mellom to DnaA-moduler som består av domene I-III ( aminosyre 1-373 fra den aminoterminalen enden av proteinet) kan påvises ved aktivering av reporter-genet *his3* i det gjær 2-hybrid systemet som ble brukt i denne oppgaven (3.11). Domene III inneholder et motiv som medierer homooligomerisering av DnaA (Mott og Berger, 2007; Messer et al., 2001). Det er her vist at interaksjonen mellom to DnaA(1-373)-moduler er så sterk at den kan påvises i det gjær 2-systemet som er brukt i denne oppgaven. Dette resultatet gjør det også sannsynlig at denne interaksjonen kan monitoreres i andre gjær 2-hybrid systemer. Det bør da også være mulig å utvikle en test for kjemiske forbindelser som viser om de bryter interaksjonen mellom to DnaA(1-373)-moduler. Interaksjon mellom DnaA(1-373)-delene av DnaA-molekyler er en forutsetning for homooligomeriseringen av DnaA ved *oriC* (Mott og Berger, 2007). Denne homooligomeriseringen initierer DNA-replikasjonen (Mott og Berger, 2007). Kjemiske forbindelser som bryter interaksjonen mellom to DnaA(1-373)-moduler kan derfor stanse initieringen av DNA-replikasjonen og siden DnaA er et bakteriespesifikt protein, vil slike forbindelser kunne ha et potensial som antibakterielle midler (se 1.2).

### 4.3 Utvikling av en positiv screen ved hjelp av *ura3* reportergen og 5-fluoroorotinsyre.

Reportergen *ura3* koder for enzymet orotidin 5'-monofosfat dekarboksylase (ODCase) som katalyserer et trinn i biosynteseveien til uracil og reaksjonen der 5-fluoroorotinsyre omdannes til 5-fluorouracil (se 1.5). I et gjær 2-hybrid system som benytter *ura3* som reportergen vil interaksjonen DnaA(1-373)-DnaA(1-373) kunne monitoreres på to ulike måter. Interaksjonen reetablerer biosyntesen av uracil og kan således avleses som vekst på et medium som ikke inneholder uracil. Interaksjonen gir også syntese av toksisk 5-fluorouracil fra 5-fluoroorotinsyre og kan avleses som manglende vekst på et medium som inneholder 5-fluoroorotinsyre. Det er ønskelig å utvikle en test som detekterer de kjemiske forbindelsene som bryter DnaA(1-343)-DnaA(1-343) interaksjonen da slike forbindelser vil kunne ha et potensial som antibakterielle midler (se 4.2). En slik test bør gi vekst ved interaksjonsbrudd da mangel på vekst kan ha helt andre årsaker enn den funksjonen som undersøkes (Fossum et al., 2008).

For gjærceller med *ura3* som reportergen vil interaksjonsbrudd gi resistens mot 5-fluoroorotinsyre og behov for uracil i mediet for vekst. På et medium som er tilsatt 5-fluoroorotinsyre og uracil vil derfor en forbindelse som bryter DnaA(1-343)-DnaA(1-343) interaksjonen gi vekst. En slik positiv screeningtest vil være velegnet for søk i store bibliotek av kjemiske forbindelser. Denne oppgaven viser at nettopp DnaA(1-343)-modulen bør brukes i en slik screeningtest.

## 5. Referansliste.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002).  
Molecular Biology of The Cell. 4<sup>th</sup> edition; Garland Science; New York.

Baker, T., Bell, S. (1998). "Polymerases and the replisome: machines within machines." Cell 92: 295-305.

Bramhill, D., Kornberg, A. (1988). "Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome." Cell 52: 743-755.

Brendler, T., Abeles, A., Austin, S. (1995). "A protein that binds to the P1 origin core and the *oriC* 13mer region in a methylation-specific fashion is the product of the host *seqA* gene." EMBO Journal 14: 4083-4089.

Boeke, J., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. (1987). "5-fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics." Methods in Enzymology 154: 164-175.

Boye, E., Løbner-Olesen, A., Skarstad, K. (2000). "Limiting DNA replication to once and only once." EMBO Reports 1: 479-483.

Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., Schlattner, U. (2009). "Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology." International Journal of Molecular Sciences 10: 2763-2788.

Burgers, J., Kornberg, A., Sakakibara, Y. (1981). "The *dnaN* gene codes for the  $\beta$  subunit of DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78: 5391-5395.



Campbell, J., Kleckner, N. (1990). "*E.coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork." *Cell* 62: 967-979.

Denyer, S., Hodges, A., Gorman, S. (2004). *Hugo & Russells Pharmaceutical Microbiology*. 7<sup>th</sup> Edition; Blackwell Publishing.

Fields, S., Song, O. (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* 340: 245-246.

Fossum, S., De Pascale, G., Weigel, C., Messer, W., Donadio, S., Skarstad, K. (2008). "A robust screen for novel antibiotics: specific knockout of the initiator of bacterial DNA replication." *FEMS Microbiology Letters* 281: 210-214.

Ishida, T., Akimitsu, N., Kashioka, T., Hatano, M., Kubota, T., Ogata, Y., Sekimizu, K., Katayama, T. (2004). "DiaA, a novel DnaA-binding protein, ensures the timely initiation of *Escherichia coli* chromosome replication." *Journal of Biological Chemistry* 279: 45546-45555.

Katayama, T. (2008). "Roles for the AAA+ motifs of DnaA in the initiation of DNA replication." *Biochemical Society Transactions* 36: 78-82.

Kato, J., Katayama, T. (2001). "Hda, a novel DnaA-related protein, regulates the replication cycle in *Escherichia coli*." *EMBO Journal* 20: 4253-4262.

Kiemer, L., Cesareni, G. (2007). "Comparative interactomics: comparing apples and pears?" *TRENDS in Biotechnology* 25: 448-454.

Kitagawa, R., Ozaki, T., Moriya, S., Ogawa, T. (1998). "Negative control of replication initiation by a novel chromosomal locus exhibiting exceptional affinity for *Escherichia coli* DnaA protein." *Genes & Development* 12: 3032-3043.

Li, B., Fields, S. (1993). "Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system."

FASEB Journal 7: 957-963.

Makise, M., Mima, S., Tsuchiya, T., Mizushima, T. (2001). "Molecular mechanism for functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids."

Journal of Biological Chemistry 276: 7450-7456.

Maresso, A., Schneewind, O. (2008). "Sortase as a target of anti-infective therapy."

Pharmacological Reviews 60: 128-141.

Messer, W. (2002). "The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication." FEMS Microbiology Reviews 26: 355-374.

Messer, W., Blaesing, F., Jakimowicz, D., Krause, M., Majka, J., Nardmann, J., Schaper, S., Seitz, H., Speck, C., Wegrzyn, G., Weigel, C., Welzeck, M., Zakrzewska-Czerwinska, J. (2001). "Bacterial replication initiator DnaA. Rules for DnaA binding and roles of DnaA in origin unwinding and helicase loading." Biochimie 83: 5-12.

Messer, W., Blaesing, F., Majka, J., Nardmann, J., Schaper, S., Schmidt, A., Seitz, H., Speck, C., Tüngler, D., Wegrzyn, G., Weigel, C., Welzeck, M., Zakrzewska-Czerwinska, J. (1999). "Functional domains of DnaA proteins." Biochimie 81: 819-825.

Messer, W., Weigel, C. (1998). "DnaA initiator-also a transcription factor."

Molecular Microbiology 24: 1-6.

Mott, M., Berger, J. (2007). "DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria." Nature Reviews. Microbiology 5: 343-354.

Nishida, S., Fujimitsu, K., Sekimizu, K., Ohmura, T., Ueda, T., Katayama, T. (2002). "A nucleotide switch in the *Escherichia coli* DnaA protein initiates chromosomal replication." *Journal of Biological Chemistry* 277: 14986-14995.

Ozaki, S., Katayama, T., (2009). "DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin." *Plasmid* 62: 71-82.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Moore, P. (2003). *Pharmacology* 5<sup>th</sup> edition; Churchill Livingstone.

Rohdich, F., Kis, K., Bacher, A., Eisenreich, W. (2001). "The non-mevalonate pathway of isoprenoids. Genes,enzymes and intermediates." *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 535-540.

Salyers, A., Whitt, D. (2002). *Bacterial Pathogenesis. A Molecular approach*. Second Edition; ASM Press; Washington, D.C..

Skarstad, K., von Meyenburg, K., Hansen, F., Boye, E. (1988). "Coordination of chromosome replication initiation in *Escherichia coli*: Effects on different dnaA alleles." *Journal of Bacteriology* 170: 852-858.

Suetsugu, M., Shimuta, T., Ishida, T., Kawakami, H., Katayama, T. (2005). "Protein associations in DnaA-ATP hydrolysis mediated by the Hda-replicase clamp complex." *Journal of Biological Chemistry* 280: 6528-6536.

Topcu, Z., Borden, K., (2000). "The yeast two-hybrid system and its pharmaceutical significance." *Pharmaceutical Research* 17: 1049-1055.

Walsh,C. (2003). "Where will new antibiotics come from?" *Nature Reviews. Microbiology* 1: 65-70.

Weigel, C., Schmidt, A., Seitz, H., Tüngler, D., Welzeck, M., Messer, W. (1999). "The N-terminus promotes oligomerization of the *Escherichia coli* initiator protein DnaA." *Molecular Microbiology* 34: 53-66.

## 6. Appendiks

Oversikt over materiale og utstyr som ble brukt i denne oppgaven:

### Medier

LB:

Trypton	10 g
Gjærekstrakt	5 g
NaCl	10 g
Destillert vann til	1000 ml

LB-agar:

LB-medium tilsatt 0,5% bacto-agar.

YPD:

Gjærekstrakt	10 g
Pepton	20 g
Dekstrose	20 g
Destillert vann til	1000ml

YPD-agar:

YPD medium tilsatt 0,5% bacto-agar.

### Bakteriestammer

CM735, *Escherichia coli* villtype (Skarstad et al., 1988)

HB01 (Denne oppgaven)

HB04 (Denne oppgaven)

HB09 (Denne oppgaven)

HB12 (Denne oppgaven)

JM109 (Promega)

XL 10-Gold (Stratagene)

## Gjærstamme

AH 109, *Saccharomyces cerevisiae* (Clontech)

## Løsninger:

### 5x TBE buffer:

Tris base	54 g
Borsyre	27,5 g
0,5M EDTA	20 ml
Destillert vann til	1000 ml

### 0,8% NaCl-løsning:

Natriumklorid pro analysi	1,6 g
Destiller vann til	200 ml
Sterilfiltrert	

## Enzym

BamHI (New England Biolabs)

BamHI-HF (New England Biolabs)

NdeI (New England Biolabs)

Pfu Ultra II fusion HS DNA polymerase (Stratagene)

T4 DNA Ligase (New England Biolabs)

T4 DNA Ligase (Promega)

Taq DNA polymerase (New England Biolabs)

## Kjemikalier

Agarose (Sigma)

Ampicillin (Bristol-Myers Squibb)

Bacto-agar (Becton, Dickinson and Company)

dATP (New England Biolabs)  
Ditiotreitol (Sigma)  
Etanol (Arcus)  
Etidiumbromid (Sigma)  
IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid)(Sigma)  
Isopropanol (Arcus)  
Kanamycin (Sigma)  
Kloramfenikol (Sigma)  
L-Adenin (Sigma)  
L-Histidin (Sigma)  
Litiumacetat dihydrat (Sigma)  
Natriumklorid pro analysi (Merck)  
Nukleasefritt vann (QIAGEN)  
PEG 3350 (Polyetylglykol 3350) (Sigma)  
SDS (Natriumdodekylsulfat) (Serva)  
X-gal (5-brom-4-klor-3-indolyl  $\beta$ -D-galaktopyranosid) (Sigma)  
3-amino-1,2,4-triazol (Sigma)

### Kommersielle blandinger

-Ade/-His/-Leu/-Trp.DO Supplement (Clontech)  
Minimal SD Base (Clontech)

### Kommersielle løsninger

2 log ladder (New England Biolabs)  
2x Rapid Ligation Buffer (Promega)  
6x Loading dye blue (New England Biolabs)  
10x Pfu Ultra Reaction Buffer (Stratagene)  
10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer (New England Biolabs)  
10x Thermo Pol Reaction Buffer (New England Biolabs)  
 $\beta$ -Mercaptoethanol mix (Stratagene)  
Bovine Serum Albumin (New England Biolabs)  
dNTP mix (25mM each dNTP) (Stratagene)

Herring Testes carrier DNA 10 mg/ml (Clontech)

NEBuffer 3 (New England Biolabs)

NEBuffer 4 (New England Biolabs)

## Plasmider

pGBKT7 (Clontech)

pGADT7 (Clontech)

pGBKT7 kuttet med NdeI og BamHI (mottatt fra Line Johnsen )

pGADT7 kuttet med NdeI og BamHI (mottatt fra Line Johnsen )

pGADT7 kuttet med NdeI og BamHI (Denne oppgaven)

pGBKT7/*dnaA*(1-86) (Denne oppgaven)

pGADT7/*dnaA*(1-86) (Denne oppgaven)

pGBKT7/*dnaA*(1-373) (Denne oppgaven)

pGADT7/*dnaA*(1-373) (Denne oppgaven)

pGBKT7/*hda* (mottatt fra Line Johnsen )

pGADT7/*dnaD* (mottatt fra Line Johnsen)

pGBKT7-T (Clontech)

pGADT7-53 (Clontech)

pGEM-T Easy (Promega)

## Prepareringskit

JETSTAR Plasmid Purification MIDI Kit (Genomed)

Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

## Primere

Primer DnaA(1-86)fw. (Eurogentec)

Sekvens: GGA ATT CCA TAT GTC ACT TTC GCT TTG GCA GCA GTG

Primer DnaA(1-86)rev. (Eurogentec)

Sekvens: GGA ATT GGA TCC TTA CGT TTG CGT CAC CGG TTT G

Primer DnaA(1-373)rev. (Eurogentec)

Sekvens: GGA ATT GGA TCC TTA CAG TTT TTC CTG CAA TGC CAG C

## Utstyr

Avbildingssystem: Chemi Genius Bio Imaging System (VWR)

Bordsentrifuge: GalaxyMini (VWR)

Elektroforesekar: Model BI (OWI)

Inkubator: Thermomixer comfort (Eppendorf)

PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.)

Sentrifuge: Centrifuge 5417 R (Eppendorf)

Sentrifuge: 5900 (Kubota)

Sterilfiltreringsoppsats: Stericup & Steritop 0,22µm (Milipore Corporation).

Strømkilde til elektroforese: Power PAC 300 (Bio-Rad)

UV Spectrophotometer: UV-1800 (Shimadzu)

Vannbad: Innova 3100. Water Bath Shaker (New Brunswick Scientific)

Varmeskap (Termaks)

Varmeblokk: QBT 1 (Grant)

Vortexer: MS2 Minishaker (IKA)